

SÉRIE A, N° 945

N° D'ORDRE :

1769

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Juliu VOICU

Licencié ès Sciences

Chef de Travaux pratiques à la Faculté des Sciences de Bucarest

1^{re} THÈSE. — INFLUENCE DU BORE SUR QUELQUES MICROBES DU SOL.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **25** Juin 1923, devant la Commission d'examen.

MM. GABRIEL BERTRAND . . . *Président.*

JEAN PERRIN } *Examineurs.*

BLAISE }

PARIS

ÉDITIONS DE LA " VIE UNIVERSITAIRE "

13, Quai de Conti, 13

—
1923

SÉRIE A, N° 945

N° D'ORDRE :

1769

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Juliu VOICU

Licencié ès Sciences

Chef de Travaux pratiques à la Faculté des Sciences de Bucarest

1^{re} THÈSE. — INFLUENCE DU BORE SUR QUELQUES MICROBES DU SOL.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *25* Juin 1923, devant la Commission d'examen.

MM. GABRIEL BERTRAND . . . *Président.*

JEAN PERRIN

BLAISE } *Examineurs.*

PARIS

ÉDITIONS DE LA " VIE UNIVERSITAIRE "

13, Quai de Conti, 13

—
1923

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

MM.

Doyen..... MOLLIARD, *Professeur*. Physiologie végétale.

Doyen honoraire..... P. APPELL.

Professeurs honoraires.. } P. PUISEUX.
VÉLAIN.
BOUSSINESQ
PRUVOT.

Professeurs.....

Emile PICARD.....	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
KOENIGS	Mécanique physique et expérimentale.
GOURSAT	Calcul différentiel et calcul intégral.
HALLER	Chimie organique.
JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
JANET	Electrotechnique générale.
WALLERANT	Minéralogie.
ANDROYER	Astronomie.
PAINLEVÉ	Mécanique analytique et mécanique céleste.
HAUG	Géologie.
H. LE CHATELIER.....	Chimie générale.
Gabriel BERTRAND...	Chimie biologique.
M ^{me} P. CURIE.....	Physique générale et radioactivité.
CAULLERY	Zoologie (Evolution des êtres organisés)
C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.
G. URBAIN.....	Chimie minérale
Emile BOREL.....	Calcul des probabilités et Physique mathém.
MARCHIS	Aviation.
Jean PERRIN.....	Chimie physique.
ABRAHAM	Physique.
CARTAN	Mécanique rationnelle.
Cl. GUICHARD.....	Géométrie supérieure.
LAPICQUE	Physiologie.
GENTIL	Géographie physique.
VESSIOT	Théorie des groupes et calcul des variations.
COTTON	Physique générale.
DRACH	Application de l'analyse à la géométrie
C. FABRY.....	Physique
Charles PÉREZ.....	Zoologie.
Léon BERTRAND.....	Géologie appliquée et géologie régionale.
DANGEARD	Botanique.
LÉSPIEAU	Théories chimiques.
LEDUC	Physique théorique et physique céleste.
MONTEL	Mathématiques générales
MAURAIN	Physique du globe.
RABAUD	Biologie expérimentale.
WINTREBERT	Anatomie et physiologie comparées.

Secrétaire..... Daniel TOMBECK



A Monsieur le Docteur E. ROUX,

*Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine,
Directeur de l'Institut Pasteur.*

A Monsieur Gabriel BERTRAND,

*Membre de l'Institut,
Professeur à la Faculté des Sciences,
Chef de Service à l'Institut Pasteur.*

A Monsieur M. JAVILLIER,

*Maître de Conférences à la Faculté des Sciences,
Directeur de Laboratoire à l'Institut de Recherches Agronomiques.*

HOMMAGES RESPECTUEUX



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552605_0005

INTRODUCTION

Le rôle des microbes dans la fertilité des sols. — La stérilisation partielle des sols. — Substances toxiques et excitantes de nature organique existant dans le sol. — Les engrais catalytiques : manganèse, zinc, aluminium, bore.

« La connaissance du rôle des infiniment petits
« chimiques, même envisagée au seul point de
« vue agricole, touche à plusieurs problèmes. Elle
« touche tout d'abord, comme vous le comprenez,
« à celui des causes de la fertilité des sols »
(Gabr. Bertrand) (*).

Parmi les facteurs qui concourent à la formation et à la fertilité des sols, celui qui joue un rôle essentiel ne fut connu que très tard. On a, en effet, jusqu'à la dernière moitié du xx^e siècle, ignoré le monde des microorganismes et surtout celui des microbes qui peuplent le sol.

Ce sont les découvertes de Pasteur, qui, en révélant l'existence des infiniment petits organisés et mettant en évidence leur rôle capital dans les fermentations et les maladies, ont orienté les recherches vers les microbes du sol.

Dès 1862, PASTEUR [123] (1), dans une note des *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, où il étudiait l'activité oxydante des *mycodermes*, s'exprimait ainsi sur le rôle que peuvent jouer les microbes oxydants dans le sol : « Il me paraît nécessaire », dit-il, « de reprendre, au point de vue de

(*) *Sur le rôle des infiniment petits chimiques en agriculture* (Conférence faite au VIII^e Congrès international de Chimie appliquée tenu à New-York au mois de septembre 1912). *Ann. Inst. Pasteur*, 1912, t. 26, p. 865.

(1) Les nombres entre crochets se rapportent à l'Index bibliographique.

« ces nouvelles idées, tout ce qui concerne la nitrification ». Ces nouvelles idées sont celles qu'il émettait alors sur la faculté qu'auraient divers microbes d'oxyder des substances variées, à l'exemple du *mycoderma acéti*. Pasteur venait de montrer que celui-ci oxyde non seulement l'alcool, mais encore « une foule de matières organiques, les sucres, les acides organiques, divers alcools, les matières albuminoïdes ».

En 1877, SCHLOESING et MÜNTZ [136, 137] mirent en évidence le caractère microbien de la nitrification; et plus tard (1890) quand WINOGRADSKY isola les microbes nitrifiants, on a eu pleine confirmation des vues de Pasteur dans cet ordre d'idées.

Une série de recherches devenues classiques, montrèrent ensuite, que, non seulement l'oxydation de l'ammoniaque, mais encore l'enrichissement du sol en azote et l'utilisation, de cet élément par les plantes sont conditionnés par les microbes.

Aujourd'hui, on connaît le caractère général de l'activité des microorganismes et on sait que, au point de vue analytique, ils minéralisent tous les éléments qui constituent la matière organique et les rendent ainsi accessibles aux plantes.

L'ensemble de ces nouvelles connaissances a changé de face nos conceptions sur la fertilité du sol; des questions jusqu'alors énigmatiques y trouvèrent une explication et la pratique agricole se trouva, de ce fait, engagée dans une voie nouvelle.

Pour ces mêmes raisons, je me propose de donner, dans ce qui suit, un aperçu du rôle des microbes dans le sol et de rappeler les facteurs qui interviennent dans la fertilité, en indiquant à la fois leur rapport avec l'existence et l'activité des microorganismes dans la terre arable.

Ainsi que nous venons de le dire, SCHLOESING et MÜNTZ prouvèrent que la nitrification dans le sol est due aux microbes.

Après ces savants, BERTHELOT [12] démontra en 1885, que de la terre, laissée en simple contact avec l'atmosphère, s'enrichit en azote, grâce aussi à l'activité microbienne.

La même année, DUCLAUX [59], directement inspiré par

Pasteur, a montré que les plantes à chlorophylle sont incapables d'attaquer par leurs propres moyens les substances organiques, quand celles-ci sont mises à leur disposition aseptiquement, dans un sol préalablement stérilisé. Les plantes ont donc besoin du concours des microbes, qui, par leurs diastases détruisent les molécules complexes des substances organiques et leur préparent ainsi des substances directement assimilables.

A la même époque, deux Allemands : HELLRIEGEL et WILFARTH, poursuivaient une série de recherches sur l'enrichissement du sol en azote par les plantes. Ils ont fixé leur attention sur les légumineuses, signalées déjà en France par G. VILLE et puis en Angleterre par LAWES et GILBERT, comme susceptibles de fixer l'azote.

HELLRIEGEL et WILFARTH [76] ont prouvé (1886) que la fixation de l'azote est intimement liée à la présence des nodosités que l'on rencontre sur les racines des légumineuses et qu'elle est uniquement l'œuvre des microbes qu'elles contiennent.

Dès 1814, DAWY avait signalé des pertes en azote dans la décomposition des substances organiques dans le sol. Par la suite, on s'est rendu compte que le phénomène est dû à une réduction partielle des nitrates en nitrites, suivie de réactions secondaires, ou, à une réduction complète des nitrites en azote.

La nature microbienne de cette dénitrification a été reconnue en 1876 par MEUSEL [106], en ce qui concerne la transformation des nitrates en nitrites et par DEHÉRAIN et MAQUENNE [54] pour la réduction totale des nitrates dans le sol.

Les microbes s'attaquent non seulement aux nitrates pour les simplifier, mais aussi aux substances azotées plus complexes : aux matières protéïques. Ce côté de l'activité microbienne a été mis en évidence par PASTEUR [124], qui, le premier montra que la putréfaction est un phénomène d'origine microbienne.

Au point de vue agricole, MÜNTZ et COUDON [113] ont démontré par leurs expériences que la désagrégation des substances protéïques dans le sol, avec production d'ammoniaque (l'ammonisation des matières protéïques), est due exclusivement aux microbes.

Au début de son travail sur les fermentations, PASTEUR [122] étudia la fermentation ammoniacale de l'urée et isola l'un des microbes qui la produit (1862).

Dans la désagrégation des matières ternaires on a constaté que les microbes interviennent également. On a reconnu que la formation de l'humus, attribuée à un phénomène d'ordre chimique, est, elle aussi, de nature essentiellement microbiologique.

Le fer, le soufre et le phosphore, sont de même sous la dépendance, plus ou moins directe, des microbes, dans le cycle qu'ils parcourent.

Le carbone, lui-même, arrivé au terme CO^2 se dissout dans l'eau qui imbibe le sol et solubilise certains des éléments minéraux, qui deviennent de ce fait utilisables pour les plantes.

Ainsi donc, par leur travail d'analyse et de synthèse, ou par les effets chimiques qu'ils engendrent, les microbes se sont montrés dans le sol, comme étant des facteurs d'une importance essentielle pour la fertilité.

Les microbes qui provoquent les transformations, dont j'ai donné plus haut un aperçu, ont par la suite été isolés et étudiés en cultures pures, sur des milieux appropriés ou sur de la terre. Par ces faits, on a été amené à considérer le sol comme un véritable milieu de culture pour les microorganismes. On s'est alors préoccupé d'y réaliser les conditions physiques et chimiques optima, nécessaires au développement des espèces microbiennes utiles.

D'après CARON [42] et d'autres savants, la fertilité du sol s'accroît avec le nombre des bactéries considérées dans leur ensemble.

CARON a isolé de la terre de son domaine d'Ellenbach, un

microbe, qu'il a nommé *Bacillus Ellenbachensis* α. Des expériences comparatives faites sur des terres inoculées avec ce microbe, lui montrèrent que celles qui avaient été inoculées étaient les plus fertiles.

A la suite de ces expériences préliminaires, la maison allemande « Bayer et C^o », mit en vente des cultures pures de ce microbe sous le nom d'*Alinite*.

L'efficacité de l'*Alinite* a été beaucoup discutée. STOKLASA et JACOBITZ ont attribué au microbe qui la constitue la propriété de fixer l'azote. Ce microbe qui est un ammonisant net, agit aussi, fort probablement, en modifiant favorablement les conditions d'existence de la flore microbienne du sol.

Dès leur découverte, les espèces fixatrices d'azote (le *Bacillus radicicola* des légumineuses, le *Clostridium Pastorianum* et l'*Azotobacter*) inspirèrent de grandes expériences sur leur emploi en culture pure, pour inoculer la terre arable et l'enrichir ainsi, indirectement, en azote. Cette idée trouva sa réalisation en 1896, quand NOBBE et HILTNER préparèrent en culture sur gélose, un mélange de plusieurs variétés de *Bacillus radicicola*, qui fut livré aux agriculteurs par la maison allemande « Höchst », sous le nom de *Nitragine*.

Dans cette voie, on a parfois obtenu d'assez bons résultats, mais, les essais que l'on tenta avec l'*Azotobacter*, n'ont que très rarement réussi et l'emploi du *Clostridium Pastorianum* n'a jamais rien donné.

Cela tient au fait que le sol est un milieu extrêmement complexe. Il ne suffit pas d'y placer des germes pour qu'ils y subsistent. Si une espèce ne s'y trouve pas normalement, ou qu'elle y est très faiblement représentée, c'est parce que les conditions favorables à son développement et à sa reproduction manquent complètement, ou, que les facteurs divers limitent son développement.

Dans cet ordre d'idées, Sir E.-J. RUSSEL [135], de la Station Expérimentale de Rothamsted, attira dernièrement (1909) l'attention sur le rôle des *protozoaires*. Ceux-ci seraient les ennemis des microbes du sol dont ils feraient leur nourriture

et leur suppression entraînerait donc, par la suite, une augmentation du nombre des bactéries. C'est d'ailleurs l'interprétation de RUSSEL, pour expliquer les effets favorables qu'exerce sur les cultures la *stérilisation partielle du sol*, soit par les *antiseptiques*, soit par la *chaleur*.

La stérilisation partielle du sol, découverte par hasard, fut pratiquée d'abord en Allemagne, en 1894, par OBERLIN [118] et ensuite en France, par A. GIRARD. Ces savants employaient le *sulfure de carbone* pour augmenter la fertilité des sols fatigués et attribuaient son heureux effet à son activité destructive sur certains germes nuisibles du sol.

Les résultats qu'ils obtinrent furent très satisfaisants, et HILTNER qui examina au point de vue bactériologique l'effet de la stérilisation partielle, trouva une augmentation du nombre des microbes dans les sols ainsi traités.

RUSSEL constata la même chose à la suite du traitement par le *toluène*. Il expliqua la multiplication des bactéries par le fait que les protozoaires, leurs ennemis, moins résistants, seraient tués par l'antiseptique.

Cette opinion, quoique combattue, reste vraisemblable, car on est arrivé à mettre en évidence dans plusieurs cas, une abondante faune de protozoaires dans le sol. De même, on a constaté après la stérilisation partielle du sol par voie chimique, une augmentation du taux de l'ammoniaque, qui ne peut être attribuée qu'à la multiplication des bactéries, dont on a trouvé alors un plus grand nombre.

Dans une expérience de Russel, la quantité d'ammoniaque formé est passée de 100 à 1900, en neuf jours et le nombre des bactéries s'est accru dans la proportion de 1100 à 100, par le traitement au toluène.

Récemment TRUFFAUT et BEZSSONOFF [150] mirent en évidence que la stérilisation partielle se traduit aussi par une augmentation du nombre de l'*Azotobacter* et surtout du *Clortidium Pastorianum* et, par suite, par un enrichissement du sol en azote.

On a émis une autre opinion sur les causes de *la fatigue des sols cultivés* : l'infertilité serait due à la présence de *substances toxiques, de nature organique*, produits par les plantes (WHITNEY [153], PICKERING [127]) par les microbes (BOTTOMLEY [32], GREIG SMITH [73]), ou par la décomposition de la matière organique.

C'est un fait anciennement connu, que la luzerne, comme d'autres plantes d'ailleurs, ne peut pas être cultivée longtemps sur une terre normale. Elle finit, après un certain nombre d'années, par refuser de s'y développer.

Les recherches de POUGET et CHOUGHAK [129] ont démontré que c'est dans la partie organique de l'extrait aqueux de ces sols fatigués par la luzerne, que se trouve la cause de leur infertilité.

On a isolé des sols fatigués des substances nocives, dont la toxicité envers les plantes a été éprouvée. Dans cet ordre d'idées, SCHREINER et SHOREY [139, 141] ont isolé d'une terre infertile, de petites quantités d'acide picoline carbonique (méthyl-pyridine-carbonique) qui, dans le sol, est toxique à la dose de un à dix millièmes.

Ils isolèrent également des sols infertiles l'acide dioxystéarique [140]. Dans une terre on en a rencontré 0,05 par kg. Sa toxicité est déjà notable à la dose de 1/50.000. Cet acide a été souvent rencontré dans des sols infertiles et son rôle nuisible nettement démontré. Et, c'est ce fait qui engagea ces mêmes auteurs, à proposer sa recherche dans les sols pour apprécier leur valeur culturale.

On a également trouvé dans le sol les acides oxystéarique, α -crotonique, lignocérique, des dérivés pyrimidiques, des bases puriques, etc. Plus récemment, on s'est occupé de la présence de l'acide cyanurique, qui, dans certaines conditions s'est montré toxique pour les plantes à la dose de 0.001 % et, dans le sol, dans une proportion de 0,02 % [143] :

A côté des corps que nous avons énumérés et qui exercent un rôle toxique dans le sol, on a signalé d'autres substances qui à de très faibles doses sont, au contraire, *utiles pour la*

croissance des plantes, ou pour le développement et l'activité des microbes. La créatinine, trouvée dans la terre par SHOREY, jouerait ce rôle. L'humus du sol, en particulier, qui en contient une quantité appréciable, lui devrait sa fertilité.

En 1911, SKINNER [144], établit que la *créatinine*, aussi que la *créatine*, ont un effet favorable sur la croissance des plantes.

Les recherches de BOTTOMLEY [33, 34], et de ses collaborateurs [109] ont montré que pendant l'humification — processus microbien — prennent naissance certaines substances qui ont une influence excitante sur la croissance des plantes et le développement des microbes. L'*Azotobacter*, microbe fixateur d'azote, serait également susceptible de produire certains de ces substances. BOTTOMLEY les a nommées « *auximones* » et les considère comme les vitamines des végétaux. D'après lui et ses élèves, l'action stimulante que possède l'humus et qui se manifeste pour un certain nombre de microbes, serait due aux *auximones* qu'il contient.

Les substances toxiques, dont nous avons précédemment signalé l'existence et qui diminuent la fertilité du sol jusqu'à la rendre parfois nulle, sont neutralisés par les sécrétions des racines des plantes, appartenant à des espèces autres que celles qui les ont engendrées. Les engrais verts, ou l'oxydation par de l'oxygène de l'air, sont également susceptibles de produire le même effet.

Il est très probable, que les antiseptiques à faibles doses, aussi que la chaleur, contribuent également à leur neutralisation. C'est encore une explication plausible des effets favorables que produit la stérilisation partielle, sur les sols fatigués, en leur rendant leur force productive.

WHITNEY poussant plus loin le développement de cette idée, admet, que les engrais joueraient plutôt, dans le sol, le rôle de substances purificatrices, que celui d'élément nutritif.

LIVINGSTONE [95] a montré, dans cet ordre d'idées, qu'on peut enlever la toxicité des extraits de terre provenant des terres infertiles, en les secouant avec du carbonate de calcium,

de l'hydroxide de fer ou d'aluminium, du charbon animal, ou avec de la terre.

De même, il a trouvé, que l'addition d'engrais, ou d'un extrait aqueux de fumier, atténue également la toxicité.

A côté des antiseptiques et des engrais dont l'action se fait sentir aussi bien sur les bactéries que sur les plantes, avec une intensité variable, il y a à considérer une autre catégorie d'agents fertilisants. Je veux citer *les engrais catalytiques*, qui représentent la conception pratique des belles recherches faites par M. GABR. BERTRAND, sur le rôle si important des *infinitement petits chimiques* dans les phénomènes de la vie. Ce sont ces éléments, qui ne se rencontrent qu'en très faibles quantités, qu'il a dénommés *éléments catalytiques* ou *olygosynergiques*.

M. GABR. BERTRAND, après avoir montré le rôle essentiel du manganèse dans les phénomènes d'oxydation provoqués par la laccase (ferment oxydant qu'il a isolé du latex de l'arbre à laque), a mis en évidence la présence constante du manganèse chez les animaux et chez les végétaux. Il précisa ensuite le rôle physiologique important que joue cet élément dans le développement de l'*Aspergillus Niger* [20, 21].

Il ressort, de même, des études faites par ce savant et ses élèves, que d'autres éléments, comme le bore, le zinc, le cuivre, pourraient également jouer le rôle d'éléments catalytiques.

A la faveur de cette nouvelle conception, un vaste champs d'étude, complètement nouveau, s'est ouvert aux chercheurs.

Des éléments, dont la présence était jusqu'alors considérée comme accidentelle, se sont montrés universellement répandus chez les êtres vivants et doués d'un rôle de premier ordre, dès que l'on eut en main une technique analytique rigoureuse et précise.

De ces découvertes, l'agriculture a largement bénéficié. C'est en 1903, au *Congrès de Chimie de Berlin*, que M. GABR. BERTRAND [13] proposa l'emploi des éléments catalytiques

comme engrais complémentaires. A la suite de ses suggestions, on entreprit dans différents pays des études expérimentales, dont on trouvera un exposé d'ensemble dans la conférence faites par ce savant au 8^e Congrès de Chimie appliquée de New-York [22].

Des premiers essais, en vases de laboratoire, furent faits au Japon par LOEW et ses élèves : ASSO, SAWA, NAGAOKA, etc., qui mirent en évidence l'effet favorable du *manganèse* sur les cultures de riz, d'orge, de blé, de haricot, de fève, de trèfle.

En 1905, M. GABR. BERTRAND [14] en collaboration avec THOMASSIN, fait des expériences, en plein champ, sur de l'avoine. En employant la manganèse comme engrais complémentaire, ils obtinrent de très bons résultats. Pour une surface de 2000 mètres carrés, ces auteurs ont employé 50 kg. de sulfate de manganèse (à 31,58 % de Mn) et comme engrais, du superphosphate minéral et du sulfate d'ammonium.

Le lot traité au manganèse a donné les augmentations suivantes par rapport au lot témoin, ayant reçu des engrais, mais pas de manganèse :

Pour l'ensemble de la récolte	22.5 %
Soit pour le grain	17.4
Soit pour la paille	26.0

Ainsi donc, une addition de manganèse correspondant à 15 kg. environ de métal par hectare, a fourni une augmentation de 450 kg. de graines et de 1.000 kg. de paille, sans compter un poids notable de racines, qui sont restées dans le sol et s'y sont transformées plus tard en humus.

D'après la nature du sol et de la plante essayée, on a obtenu dans d'autres expériences jusqu'à 40 % d'augmentation de récoltes.

L'effet du *bore* sur la croissance des plantes a été étudié par AGULHON [1, 2, 3]. Je reviendrai plus tard sur ces expériences. Pour le moment, je citerai le cas, où, sur une terre en jachère, il a obtenu pour le maïs fourrage, des augmentations de 50 %

et de 39 % avec 5 et 10 kg. de bore (à l'état d'acide borique) par hectare.

Des expériences du même ordre avec l'*aluminium* ont été faites par M. GABR. BERTRAND en collaboration avec AGULHON [23] et par STOKLASA [146, 147]. Cet élément s'est montré, lui aussi, favorisant à faibles doses pour certaines cultures. STOKLASA constata un effet favorable de l'*aluminium*, à la dose de 9 kg. par hectare, sur la betterave à sucre.

Le *zinc*, lui-même, dont le rôle si important dans le développement de l'*Aspergillus niger* a été mis en évidence par les expériences, aujourd'hui classiques, de RAULIN [131], puis par les minutieuses recherches de M. M. JAVILLIER [81], devait également attirer l'attention des chercheurs.

Il s'agissait de déterminer si cet élément, qui s'était montré si actif à des doses infimes sur les cultures d'*Aspergillus Niger*, possédait une action sur le développement des végétaux supérieurs. JAVILLIER [82, 83], le premier, essaya de répondre à cette question. A cet effet, il cultivait du blé, aseptiquement, dans un milieu nutritif, liquide, qui contenait du zinc en quantités variables. Avec de très petites doses de cet élément (1/5.000.000 à 1/250.000) il a obtenu une augmentation appréciable du rendement en matière sèche. Ce résultat a apporté la preuve, que cet élément pourrait, dans certaines conditions, être employé comme engrais complémentaire. En effet, les expériences faites ultérieurement, en pleine terre, sur du maïs, ont montré son influence favorable sur les cultures, où l'on put constater une augmentation du rendement de la récolte sèche atteignant 18-25 % [82].

MAZÉ [105], à son tour, a montré que le zinc est non seulement utile, mais indispensable pour le développement du maïs ; il en est de même pour le bore et pour certains autres éléments.

Tous ces éléments, que nous avons cités — et à côté desquels nous aurons fort probablement à ranger prochainement le nickel et le cobalt, dont la présence vient d'être constatée par MM. GABR. BERTRAND et MOCRAGNATZ [28, 29] dans la terre

arable — sont à considérer, aussi, dans leurs rapports avec les microbes et avec le sol lui-même.

Dans le sol, nous avons vu que l'on admet l'existence des substances toxiques qui rendraient la terre infertile et que ces substances seraient, d'après certains auteurs, neutralisées d'une manière spontanée, par des plantes, ou par un phénomène d'oxydation dû à l'oxygène de l'air. Les engrais complémentaires pourraient agir aussi bien dans ce sens : le manganèse, p. ex., agirait en facilitant les oxydations.

« Il est intéressant de remarquer, dit M. GABR. BERTRAND [22], que, lorsqu'on ajoute une substance fertilisante au sol, on n'agit pas uniquement sur la plante dont on veut augmenter la récolte. On modifie encore, dans un sens ou dans l'autre, la nutrition des bactéries, des champignons, et de tous les êtres microscopiques qui vivent dans le sol. Il n'est pas impossible, qu'en ajoutant du manganèse, par exemple, on favorise sélectivement certains microbes oxydants capables de former des nitrates ou de détruire les produits toxiques, comme ceux dont je vous parlais tout à l'heure. »

Mais, de toutes ces influences, la plus intéressante est indubitablement celle que peuvent exercer les éléments catalytiques sur la flore microbienne du sol, étant donné le rôle prépondérant que celle-ci joue dans la production agricole.

Les recherches entreprises à l'Institut Pasteur, dans le laboratoire de M. GABR. BERTRAND, par OLARU [119, 120], ont montré l'effet favorable de faibles doses de sulfate de manganèse sur la plupart des microbes du sol. L'action favorisant est très nette pour le *Clostridium Pastorianum* et l'*Azotobacter chroococcum*, et devient considérable pour le *Bacillus Radicicola*.

L'effet du bore, aussi bien à faibles doses qu'à des doses élevées, sur les microbes du sol, n'a pas à notre connaissance encore été étudié. On a reconnu que l'acide borique et le tétraborate de sodium sont, en général, de faibles antiseptiques pour les microbes. Leurs effets toxiques ont été men-

tionnés presque exclusivement à l'égard des microbes pathogènes.

La toxicité de l'acide borique et des borates les a fait employer en agriculture, soit pour conserver les fourrages [44], soit comme larvicides dans les fumiers. Dans ce dernier cas, [46] leur emploi se fait avec prudence, par crainte de nuire aux récoltes.

Ce travail que je présente comme thèse de doctorat ès Sciences Physiques est une étude sur : l'« Influence du bore sur quelques microbes du sol ». Ce sujet m'a été proposé par M. GABR. BERTRAND en vue d'apporter une contribution à la mise au point de l'emploi du bore comme engrais, dont les expériences d'AGULHON ont déjà souligné l'intérêt.

Considéré seulement dans ses résultats immédiats, ce travail représente juste ce qu'annonce son titre et, par cela même, il vint combler aussi la lacune que nous signalions précédemment.

Je prie M. GABR. BERTRAND, Membre de l'Institut, Professeur à la Sorbonne, Chef de service à l'Institut Pasteur, de bien vouloir trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour le bienveillant accueil qu'il m'a fait dans son laboratoire à l'Institut Pasteur et pour les précieux conseils qu'il m'a toujours donnés, avec la plus grande bienveillance, au cours de mes recherches.

Je dois également exprimer mes vifs remerciements à M. JAVILLIER, Maître de Conférences de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences, Directeur du Laboratoire de Chimie Physiologique de l'Institut des Recherches agronomiques, pour le bienveillant intérêt qu'il m'a toujours témoigné, pendant mon séjour au laboratoire de Chimie Biologique de l'Institut Pasteur.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER.

- § I. — L'influence du bore sur les végétaux inférieurs et sur la croissance des plantes : comme toxique et excitant. — Son emploi en agriculture.
- § II. — La question de la toxicité des engrais contenant du bore envers les récoltes.
-

§ I^{er}.

Le bore, sans parler des roches et des minéraux où l'on peut le rencontrer, a été retrouvé dans le monde inorganisé, partout, où on l'a cherché : dans l'eau de la mer, dans les eaux minérales et dans les eaux de rivières.

Il était à présumer que la terre arable devait aussi en contenir. A notre connaissance, on n'a pas encore fait d'étude systématique sur ce sujet.

On a eu l'occasion, au cours d'expériences dans lesquelles on cherchait à se rendre compte de l'influence du bore sur les cultures, de déterminer la teneur normale en bore des sols sur lesquels on expérimentait.

C'est ainsi, que dans quelques échantillons de terre analysés par F. Cook aux Etats-Unis, on a trouvé des teneurs de bore (exprimées en acide borique) allant de 1 à 5 mgr. par kg. de terre.

Il fallait s'attendre à trouver cet élément tout aussi disséminé chez les êtres vivants. Mais, les différents auteurs qui se

sont occupé de cette question, n'ont pu se mettre facilement d'accord.

Le plus souvent, n'existant qu'à l'état de faibles traces, le bore, a échappé aux chimistes qui ne disposaient pas d'une méthode analytique appropriée et suffisamment sensible.

M. GABR. BERTRAND [25], en collaboration avec AGULHON a, dans ce but, établi et mis au point une méthode pour le dosage du bore en de très faibles quantités. Cette méthode, d'une extrême sensibilité, permet de doser jusqu'à 5/10.000 de mg. de bore et d'en décèler des quantités encore plus faibles.

Ce savant [24], avec le même collaborateur, a recherché systématiquement le bore dans diverses espèces du règne animal et du règne végétal.

Ils ont constaté que si chez les animaux il est tout aussi répandu que chez les végétaux, il n'y existe cependant qu'en plus faible proportion.

A la suite de ces résultats qui démontraient la présence du bore chez tous les êtres vivants, M. GABR. BERTRAND s'est demandé si le bore ne jouait pas un rôle physiologique et ne pouvait pas, ainsi que le manganèse, être considéré comme un élément catalytique.

Sous son inspiration, AGULHON [2, 3] entreprend et développe cette idée. Les résultats qu'il a obtenus firent l'objet d'une thèse de doctorat, dont je ne donnerai qu'un bref aperçu.

AGULHON a recherché l'effet de l'acide borique d'abord sur quelques végétaux inférieurs : *levure*, *ferment lactique*, *Aspergillus niger*. Dans ce cas, les faibles doses de bore furent sans effet, tandis que les doses fortes se montrèrent plus ou moins toxiques.

Au moment où AGULHON commença ses travaux, un fait très curieux avait déjà été remarqué par DIENERT [58]. Il avait observé qu'une levure accoutumée au glucose, ne fait pas fermenter une solution de galactose additionnée d'acide borique. La dose de 0.66 % d'acide borique étant la dose où ce

phénomène présentait le plus de netteté. Mais, une levure préalablement accoutumée au galactose fermentait d'ailleurs bien ce sucre dans des milieux boriqués.

En présence de l'acide borique, la levure ne s'accoutume pas au galactose, mais, elle fait toujours fermenter une solution de glucose additionnée de la même quantité d'acide borique.

AGULHON, reprit cette idée et chercha à préciser les conditions du phénomène.

Cet auteur a également déterminé l'influence de l'acide borique sur la *germination des grains de blé*. Il étudia la marche de la germination dans du sable arrosé avec des solutions d'acide borique de concentration variable, allant jusqu'à 5 gr. par litre. Dans ces conditions on ne constata aucun effet : ni favorable, ni nuisible.

Pour les plantes, les expériences furent faites de trois manières différentes : en milieu synthétique stérilisé, dans du sable arrosé avec le même liquide nutritif, et sur de la terre (soit en pots, soit en parcelles libres).

Sur milieu liquide, dans des conditions aseptiques, les résultats avec le *blé* furent les suivants :

Bore, mgr. ⁰⁰ / ₀₀	2.5	5	10
Augm. % poids frais	42	37	41
Augm. % poids sec	18	38	40

On voit, que pour cette graminée *l'acide borique a un effet favorable très net*, pour une concentration de 10 mgr. de bore par litre.

Sur du sable — 2 kg. par pot — arrosé avec la même solution nutritive (500 cc.), *le blé s'est toujours montré favorisé* dans sa croissance, par de faibles doses de bore.

Pour l'*avoine*, dans les mêmes conditions, l'influence est encore *plus nette* que pour le blé. Ainsi, on a eu une augmentation en matière sèche de 59 % pour la dose de 0.05 % de bore et de 16.4 % pour la dose de 0.5 gr. de bore par pot.

Les *radis*, ont été aussi *très avantagés* par ce métalloïde de

0.05 % de bore a produit une augmentation de 39.7 % et 0.5 % une augmentation de 25 % en rendement sec.

Sur de la terre, dans des pots, le *maïs*, le *pois*, le *cresson*, ont été nettement favorisés.

0.5 gr. de bore par pot de 1.200 gr., a donné une augmentation de 13.7 % en rendement sec pour le *maïs* et de 55,88 % pour le *pois*. Pour ce dernier, 1 mgr. de bore par 1.200 gr. de terre, produisait déjà une augmentation de 35.92 % en rendement sec.

Seule la *vesce cyanhydrique*, dans les mêmes conditions de culture, n'a présenté aucune augmentation sous l'influence du bore. A partir de la dose de 10 mgr. de bore, par pot de 1200 gr. de terre, la récolte de cette légumineuse diminue.

Avec la *luzerne* on a obtenu une augmentation en rendement sec de 28 %, pour 5 mgr. de bore dans 1.200 gr. de terre.

Les expériences en *pleine terre* furent conduites sur trois parcelles.

La première parcelle n'a pas reçu de bore, la deuxième en a reçu 0.5 par mètre carré et la troisième, 1 gr. par mètre carré.

Voilà comment se sont comportés les différentes plantes expérimentées.

Pour le *pois* (variété prince Albert) et l'*avoine*, la dose de 0.5 par mètre carré n'a pas eu d'action ; mais la dose de 1 gr., par mètre carré, ajoutée à la troisième parcelle, se montra toxique.

Le maïs supporte très bien le bore. Ainsi :

Gr. de bore par m. carré	0.5	1
Augment. frais	56 %	61 %
Augment. sec.	50 %	39 %

Le *colza* et le *navet* furent également favorisés par le bore sur les deux parcelles.

De toutes ces expériences on peut conclure que des plantes

peuvent réagir favorablement au bore, pour des doses optima de cet élément, variables selon l'espèce.

AGULHON constata que le maïs qui pour la dose optima a donné la plus belle récolte, n'a pas absorbé, pour un même poids de plante, une quantité plus grande de bore que celle qu'il a absorbé dans un sol normal, non additionné de bore.

Le fait est analogue à celui constaté précédemment par M. GABR. BERTRAND, sur les cultures en sol additionné de manganèse.

Ces faits devaient laisser supposer que le bore pourrait, comme le manganèse, remplir un rôle physiologique chez les plantes.

Pour serrer de plus près le problème, AGULHON entreprend, dans la troisième partie de son travail, l'étude de l'*action du bore sur les diastases*. A la suite de ses expériences il conclut : « On peut donc dire qu'en dehors de la lipodiasse, où l'on « n'est d'ailleurs pas sûr qu'il agisse directement sur la « propriété diastasique, l'acide borique est un corps remarquablement inactif, à la fois dans le sens favorable et le sens « défavorable, sur les actions des ferments solubles ».

Et plus loin : « En tout cas, il ne paraît pas avoir sur aucune « des diastases étudiées un rôle analogue à celui du manganèse « sur la lacase. Le rôle catalytique du bore reste à découvrir ».

Un peu plus tard, *en cultivant du maïs aseptiquement* sur milieu synthétique, MAZÉ [105] reconnu que le bore était non seulement utile pour cette plante, mais voir même indispensable. En son absence le maïs pousse mal, pour ne pas dire pas du tout.

En conséquence, *le bore vient se placer à côté de l'aluminium, du zinc, du fluor du silicium, etc.*, et accroître ainsi le nombre des éléments considérés comme *nécessaires* pour la croissance de cette graminée.

MAZÉ ne généralise pas le rôle du bore, car, il se peut, que toutes les plantes n'aient pas les mêmes besoins que le maïs.

Les premières recherches sur la *toxicité du bore* sur les plantes, furent entreprises en France par PELIGOT [126], en 1876.

Il arrosait des *haricots*, âgés d'un mois, avec de l'eau contenant 2⁰⁰/₀₀ de borate de soude ou de potasse, ou de l'acide borique. PELIGOT constata qu'un seul arrosage suffit pour que les feuilles jaunissent d'abord, et que la plante meure ensuite.

Un an avant, en 1875, E. HAEKEL [75] a essayé de déterminer l'effet des borates, sur la germination des graines de *Raphanus Sativus* (*radis*); et il s'aperçoit qu'une concentration de 1.25% de borate, retarde la germination de un à trois jours et qu'une dose de 3%, l'arrête complètement.

En 1890, un Allemand, ED. HOTTER [79], expérimenta sur le pois et le maïs pour établir la limite inférieure de la toxicité de l'acide borique. Il constata que les doses faibles d'acide borique sont inoffensives et qu'une dose de 10 mgr. 00/00 (dans solution nutritive) n'est pas encore nocive. Les doses plus fortes détruisent le *chlorophylle* et tuent les racines. HOTTER a trouvé également, que le pois est moins sensible au bore que le maïs.

J. LOEW (1), en 1892, montra que *certaines algues* (*Spirogyra* et *Vaucheria*) possèdent une *grande résistance* vis-à-vis du bore.

Dans la même année, MOREL [111] exprima l'opinion que des solutions très faibles d'acide borique arrêteraient le développement de quelques champignons inférieurs. MOREL envisagea comme conséquence de cette propriété, la possibilité d'employer l'acide borique pour combattre les maladies des plantes : le *mildiou*, l'*antracnose*, etc., ainsi que l'on fait avec le sulfate de cuivre.

Au Japon, NAKAMURA [116] essaya l'effet du borax sur la *croissance du blé*, cultivé en pots. Il a trouvé que des quantités de borax équivalentes à 0.001 % d'acide borique sont toxiques

(1) *Flora*, 1892, p. 374 (Cité d'après F. CZAPEK. *Biochemie der Pflanzen*, 1920, Zweiter Band, p. 365).

et que des quantités de borax équivalentes à 0.0002 % d'acide borique ne sont que très légèrement nuisibles.

NAKAMURA a constaté aussi, que la dose de 0.0001 % d'acide borique en culture liquide, stimule l'épinard, mais a une légère action nuisible sur le pois.

HASELHOFF [74], en Allemagne, montra en 1913, que l'action du bore est plus marquée sur les haricots que sur l'avoine ou le maïs. Et que de faibles quantités de bore stimulent la croissance des haricots et du maïs, tandis que des quantités plus fortes sont nuisibles. Cette constatation lui permit de conclure, que, pour qu'un sol puisse être favorable à la culture, la quantité de bore qu'il contient ne doit pas dépasser 0.0001 % (évalué en acide borique).

En Angleterre, BRENCHEY, E. WINIFRED [40], étudie l'action des composés du zinc, de l'arsenic, et du bore, sur la croissance du blé en milieu liquide. Il trouve, que l'acide borique est moins toxique que les composés du zinc et de l'arsenic.

D'après ce savant, l'acide borique est nuisible à des doses supérieures à dix millionièmes et semble avoir une action stimulante à des dilutions plus faibles (0.05 millionièmes).

BRENCHEY établit aussi, que au-dessous d'une certaine dilution le bore tend à produire des racines et des pousses plus vigoureux, et que les concentrations plus fortes sont toxiques pour presque toutes les espèces végétales, à part certains champignons.

D'après ce même savant, la croissance du pois est stimulée par des concentrations relativement fortes d'acide borique.

VOELKER [152], dans des expériences faites en pots, trouve que 0.005-0.100 % d'acide borique ou de tetraborate de soude sec, empêchent la germination du blé. Il constate de même, qu'une dose de 0.001 % de chacune de ces substances est nuisible ; mais que des concentrations de 0.0005 à 0.001 % sont avantageuses et que l'efficacité augmente avec la dilution.

Récemment (1918), CURTIS [52], constata que le bore, de même que les sels d'Al, Fe, Mn, P^2O^5 , a une faible action stimulante sur la pousse des racines sur les boutures.

En 1913, aux Etats-Unis, F. C. COOK [47] entreprend une étude sous les auspices du Bureau d'Entomologie, de Chimie, et de l'Industrie des Plantes du Département de l'Agriculture, qu'il intitule : « le Bore, son absorption et sa distribution dans les plantes et son effet sur la croissance ».

Le bore fut introduit dans le sol sous forme de *borax* ou de la *colémanite* (borate de calcium) calcinée, ajoutée au *fumier de cheval* dans le but d'y tuer les larves de mouches. On a fait parallèlement des expériences dans des conditions analogues avec du fumier sans bore.

Le borax fut ajouté au fumier dans la proportion de 0.62 pounds (1) pour 8 bushels (2) (égal en vol. à 10 pieds cc.) (3) et la colémanite dans une proportion de 0,75 pounds pour 8 bushels ; ce qui revient à 0.54 pounds de borax pour 100 pounds de fumier.

De ce *fumier boriqué* on a employé 15 tonnes par acre ; ce qui revient à 0,0015 % de borax dans les 6 inches (1), de la couche superficielle du sol.

Ces expériences furent répétées en *plein champ*, dans quatre stations agricoles différentes. On fit en même temps des cultures en pot sur de la terre, avec une teneur en bore semblable. Dans ce dernier cas les expériences furent effectuées dans des serres. Les essais portèrent principalement sur les plantes suivantes : le blé, la betterave, les tomates, les laitues, la vesce, la pomme de terre, le maïs, les radis.

Cette dose de 0,0015 % de borax n'a eu d'action stimulante sur aucune de ces plantes ; mais elle a nuit aux légumineuses qui s'en sont montrées très sensibles.

Le blé, cultivé sur une parcelle traitée avec 20 tonnes de fumier boriqué par acre (aprox 0,002 % d'acide boriqué), a donné une récolte inférieure de 10 % à celle d'une parcelle

(1) 1 pound = 543 gr. 5926.

(2) 1 bushel = 36 l. 34766.

(3) 1 pied lin. = 12 pouces (inches) = 0 m. 3048.

(4) 1 inche = 1/12 d'un pied = 2 cm. 54

qui avait reçu la même quantité de fumier sans bore. Mais la récolte de la parcelle traitée au fumier boriqué a toujours été supérieure à celle d'une parcelle qui n'avait pas reçu du fumier.

L'auteur conclut qu'il ne faut pas dépasser la dose de 0,0015 % de borax dans le sol et que cette dose doit encore être abaissée pour les légumineuses.

En poursuivant ses études sur l'influence du bore envers certaines plantes cultivées, Cook a également fait *quelques observations relatives à l'influence du bore sur l'activité microbienne dans le sol*. Dans cet ordre d'idées, il a montré la présence des nitrates et des nitrites dans trois ou quatre tas de fumier préalablement traité par le borax ; tandis que des tas de fumier non additionnés de cet antiseptique ne contenaient ni nitrates ni nitrites.

Cook constata de même, que des sols traités par du fumier boriqué contenaient plus de nitrates que les sols de contrôles traités par du fumier sans bore.

Dans une *autre série d'expériences* [48], commencée en 1913 et prolongée pendant *trois années*, Cook a essayé de s'assurer si le bore apporté chaque année au sol par le fumier boriqué (borax ou colémanite), *ne s'accumulait pas à la longue* dans la terre, et n'avait de ce fait, par la suite, une action nuisible plus intense.

Pendant la première année (1913) on avait ajouté 0,33 pound de borax pour 1 bushel de fumier. Pendant les deux années suivantes (1914 et 1915), une partie de fumier employée a été traitée par 0,08 pound de borax par bushel et une autre partie, par 0,095 pound de colémanite par bushel.

On a calculé que si l'on éparpille sur un acre, 20 tonnes de fumier traité par 0,08 pound de borax par bushel, *100 parties de terre, contiennent 0,0022 d'acide borique dans la couche supérieure du sol, épaisse de 6 inches*. Et dans le cas du fumier contenant de la colémanite, il y a dans les mêmes conditions, 0,0029 % d'acide borique.

La quantité de borax introduite la première année, par acre, avec 20 tonnes de fumier contenant 0,33 pound de borax par bushel, représente, dans la couche supérieure du sol épaisse de 6 inches, une concentration de 0,0088 %.

En rapportant à la surface, on a répandu, la première année, 154 pounds d'acide borique par acre ; la deuxième et la troisième année, 38,5 pounds par acre.

Le lot de terre à colémanite reçoit du bore à raison de 50,75 pounds d'acide borique par acre, chaque année.

Dans ces conditions d'expériences, voici ce qu'on a constaté : à Arlington, Va., en 1913 (la première année), la dose de 0,0088 % d'acide borique, sous forme de borax, a été toxique pour le blé, tandis que les doses de 0,0022 % à l'état de borax, ou 0,0029 % sous forme de colémanite n'était pas toxiques.

Pendant les années 1914 et 1915, *le borax réduit la récolte en grains de 10 %* comparativement à la parcelle de contrôle traitée par fumier non boriqué.

Par contre, la colémanite aurait plutôt eu un très léger effet stimulant.

La parcelle sans fumier, pendant ces deux années, a toujours donné une récolte plus faible.

L'analyse des échantillons de sols prélevés chaque année, a montré que les sols qui ne convenaient pas aux plantes, étaient ceux qui contenaient du bore soluble.

Pour Cook, la rapidité avec laquelle le bore se transformerait dans le sol en combinaisons insolubles, varie avec chaque sol, ou mieux, avec chaque type de sol, avec le climat et d'autres facteurs.

A la suite des précédentes expériences, cet auteur n'a pu constater qu'il y avait réellement une accumulation du bore dans le sol.

Les indications que fournissent les recherches de Cook sur les teneurs annuelles en azote total et ammoniacal des différentes parcelles de sol, présentent, pour mon travail, un intérêt particulier.

L'azote ammoniacal, déterminé par la méthode à l'oxyde de magnésium, croît graduellement dans tous les échantillons de sol de 1914 à 1916.

Le taux d'ammoniac, dosé par la technique de FOLIN (entraîné par courant d'air) était plus élevé en 1915 qu'en 1916. En 1915, le contenu en azote total fut également le plus élevé.

On constata pendant les années 1915-1916, que les sols traités au borax ou à la colémanite, contenaient moins d'azote nitrique que les sols de contrôle traités seulement par du fumier non boriqué ; cependant, l'échantillon du sol traité avec le borax était plus riche en azote nitrique que celui du sol de contrôle de 1914.

Le *troisième mémoire* de COOK [49] sur une série d'expériences faites en collaboration avec J.-B. WILSON est intitulé : « *le Bore : son effet sur les récoltes et sa distribution dans les plantes et le sol des différentes régions des Etats-Unis* ».

Ces expériences durèrent *trois ans* et portèrent sur plusieurs variétés de plantes. Cette fois-ci, le *fumier boriqué* contenait seulement 0,08 pound de borax ou 0,095 pound de colémanite par bushel. A cette dose, il est admis que le bore est encore un larvicide efficace.

En répandant *16 tonnes* de fumier boriqué *par acre*, on peut estimer que la quantité d'acide borique contenue dans la couche superficielle du sol, en lui attribuant une épaisseur de 6 inches, est égale à 0,00176 % d'acide borique, quand on a employé du borax, et à 0,00232 %, quand on a employé de la colémanite.

Quand le fumier boriqué est employé en raison de 24 et 40 tonnes par acre, on a, dans la couche supérieure du sol épaisse de 6 inches, 0,00264 % et 0,0044 % d'acide borique, dans le cas du borax ; et 0,00348 et 0,0058 % d'acide borique, dans le cas de colémanite.

Les expériences furent effectuées en Californie, à Walnut Creek, sur l'orge et sur les pêchers ; et à Benton Harbor (Michigan), sur du blé. Elles durèrent seulement une saison,

pendant laquelle on ne fit qu'un seul épandage de fumier, à raison de 16 tonnes par acre.

En 1914 on commença de nouvelles expériences à Arlington, Va, à la ferme du *Bureau de l'Industrie des Plantes*, qui durèrent deux saisons. Les expériences entreprises à Bethesda, Md., à la ferme du *Bureau de l'Industrie Animale*, durèrent trois saisons. On employa le fumier à raison de 16, 24 et 40 tonnes par acre.

Je ne tirerai des conclusions du mémoire se rapportant à toutes ces recherches, que les résultats qui peuvent présenter un intérêt pour mon travail.

L'addition aux sols de 0,00176 % d'acide borique, sous la forme de borax, ou de 0,00232 % d'acide borique sous la forme de colémanite, n'ont pas influencé la croissance et les récoltes de blé ou d'orge ; par contre, il semble que le bore ait eu un *effet favorable* sur les pêchers.

Dans aucun des sols traités, il n'y avait de bore soluble (1).

A Bethesda, où l'on a employé des concentrations plus fortes, les résultats furent les suivants : *l'addition de 0,0044 % d'acide borique* (à l'état de borax) ou de 0,0058 % d'acide borique (sous forme de colémanite) *n'a pas eu*, dans la première saison, *d'action* sur la laitue, les épinards, le chou frisé (2) et oignons. Mais, *le même pourcentage*, dans la première saison, s'est trouvé avoir une *action nuisible* à la ferme d'Arlington, sur les laitues et les épinards, le chou frisé et le chou. A la même ferme, 0,00264 % d'acide borique (sous forme de borax) et 0,00348 % d'acide borique (sous forme de colémanite) diminue la récolte en épinard et le chou frisé en retardant la germination.

En présentant ces résultats, l'auteur ajoute que les différences d'action du bore au même pourcentage, sur les récoltes des deux stations est « *plutôt frappante* » (rather striking).

Dans la deuxième saison, 0,00176 % d'acide borique (sous

(1) Le bore soluble fut dosé dans l'extrait préparé en traitant 50 gr. de terre avec 200 cc. d'acide chlorhydrique 1/20.

(2) *Brasica oleracea capitata* (« Kale », en anglais).

forme de borax) s'est montré nuisible à une culture de haricots verts à Arlington et à Béthesda ; 0,00232 % d'acide borique, sous forme de colémanite, s'est également montré *nuisible* à une culture de haricots verts à Arlington, tandis que à Béthesda le même pourcentage de colémanite n'avait aucune action ; mais 0,00348 % d'acide borique, à l'état de colémanite, nuit aux haricots verts à Béthesda.

A Arlington, 0,00264 % d'acide borique (sous forme de borax) et 0,00348 % d'acide borique (sous forme de colémanite) *réduit* le rendement du blé et du navet, tandis que à Béthesda la même dose n'a aucun effet.

A Béthesda, 0,0044 % d'acide borique (sous forme de borax) et 0,0058 % d'acide borique (sous forme de colémanite) *réduit* la récolte de pommes de terre et de blé.

On constate, que les végétaux puisent plus de borax dans le sol, à Arlington qu'à Béthesda.

A Béthesda le seigle a encore poussé la troisième saison, après la troisième application de fumier boriqué. La récolte de seigle s'est trouvée réduite sur des parcelles qui avaient reçu 24 et 40 tonnes de fumier par acre, non tant par la présence du bore, que par l'addition d'une trop forte proportion de fumier.

Ces auteurs constatent des différences entre les sols, qui sont plus ou moins aptes à atténuer la toxicité du bore pour les plantes. La quantité de bore absorbée par la plante, dépend plus de la nature du sol que de la quantité de bore qui y a été ajoutée.

Des échantillons de terre furent prélevés en 1915 sur différentes parcelles et l'on y dosa les *nitrate*s et l'*ammoniac*.

Voici les résultats obtenus sur les échantillons de sols provenant d'Arlington, Va. :

Ac. borique % ajouté dans la couche supér. du sol, épaisse de 6 inches	Azote nitrique %	Azote ammoniacal (méthode de Folin)
0,00176 sous forme de borax	0,00133	0,0016
0,0044	0,01106	0,0023
0,00232	0,00138	0,0016
0,0058	0,00216	0,0021
contrôle (sans bore) avec 40 tonnes de fumier par acre	0,00263	0,0017

On voit que le taux des nitrates, sauf pour le lot à 0,0044 % d'acide borique (sous forme de borax) est toujours inférieur à celui de la terre de contrôle.

La teneur en ammoniac (dosé d'après FOLIN) est en moyenne légèrement supérieure dans les sols qui ont reçu du fumier boriqué à celle des sols qui ont reçu la même quantité de fumier sans bore.

D'autres échantillons de sol, prélevés au mois d'octobre de la même année (1915), à Arlington, ont donné :

Ac. borique % ajouté dans la couche supérieure du sol, d'une épaisseur de 6 inches	Azote nitrique %	Azote ammoniac. (Folin) %	Bore total (ac. borique) %
0,00176	0,0049	0,00042	0,00010
0,0044	0,0056	0,00083	0,00014
contrôle, avec 40 tonnes fumier sans bore	0,0051	0,00083	0,00005

On constate qu'on ne peut attribuer au bore *aucun effet appréciable sur l'ammonisation et la nitrification.*

Dans ces échantillons, on n'a jamais trouvé du bore soluble, mais seulement de faibles quantités de bore insoluble.

A ce même point de vue, on a également analysé des échantillons de terre provenant de Béthesda Md. (1914-15).

On a constaté que l'azote total et l'ammoniac dosable par distillation avec de l'oxyde de magnésium, varie considérablement d'une année à l'autre ; par contre, des échantillons

pris la même année, sur les diverses parcelles, ont donné des résultats comparables.

La quantité d'ammoniac, dosée par la méthode de FOLIN, est plus grande dans les échantillons prélevés le 1^{er} juin 1915, après la première fumure, que dans les échantillons prélevés après la deuxième et la troisième fumure. Mais, le bore ne peut pas être tenu comme responsable de ces variations, car, on a constaté des variations dans le même sens sur le lot de contrôle (fumier sans bore).

Pour les nitrites, qui sont partout en décroissance chaque année, on a fait la même observation.

Dans aucun échantillon de terre, on n'a trouvé de bore soluble.

J'ai analysé de plus près ces mémoires de COOK et de COOK et WILSON, parce qu'ils se rapportent à des expériences variées et de grande envergure, relatives aux effets du bore sur diverses espèces de plantes cultivées dans des sols différents.

De plus, les auteurs se sont préoccupés de l'influence que pourrait avoir le bore introduit dans le sol, sur l'activité microbienne et nous ont rapporté, sur ce sujet, les quelques observations que j'ai précédemment rappelées.

Leurs études, en laissant entrevoir les difficultés et la complexité que présentent des recherches de cet ordre, nous laissent toutefois apercevoir nettement les lacunes qu'elles présentent au point de vue microbiologique.

C'est cette constatation, qui, pour une bonne partie, m'a décidé à orienter mes recherches dans cette voie. Je m'y suis engagé avec l'espoir d'apporter une contribution à l'interprétation de certains cas curieux (constatés même dans les travaux que je viens de résumer) et que, ni la chimie du sol, ni la physiologie des plantes, ne suffisent à expliquer.

À côté des observations d'ordre microbiologique, quant à l'action du bore dans le sol, contenues dans le mémoire que je viens d'analyser, il faut citer encore celle d'AGULHON, sur

les microbes des nodosités et celle de LIPMANN, sur les microbes ammonisants.

AGULHON [2], dans ses expériences faites sur la terre, sur l'effet du bore envers les plantes, a déjà constaté que l'addition d'une proportion même relativement élevée de bore, *n'empêche pas la formation des nodosités sur les racines de la vesce cyanhydrique*. Ainsi, pour une dose de 50 mgr. de bore par 1.200 de terre, cette légumineuse présentait toujours de très belles nodosités.

LIPMANN J.-G. [94] a trouvé de son côté, en 1910, qu'un carbonate de calcium commercial contenant du bore, *a nuit à la croissance des plantes* et a également réduit le pouvoir ammonisant de la flore microbienne du sol.

§ II

En 1917, dans l'Indiana (Etats-Unis), on signala des *domages sur les récoltes* ; et les recherches que l'on entreprit alors, firent connaître qu'elles étaient dues à la présence du *borax dans les engrais*. Le professeur CONNER [43], qui étudia la question, conclut que l'apport au sol, de 112 kg. par hectare d'un engrais contenant 2 % de borax anhydre, est déjà nuisible.

Les engrais incriminés étaient des sels de potasse américains. Un d'eux, qui a servi aux essais, contenait 6,25 % de borax.

On a également constaté que le salpêtre de Chili pouvait contenir de petites quantités de bore.

La dose qui détermine une *intoxication grave* est pour le blé de 2 kg. 300 à 3 kg. de borax par hectare, et pour le coton, de 9 à 10 kg. par hectare. Pour les *pommes de terre*, 20 kg. de borax par hectare se montrèrent *extrêmement toxiques* ; des quantités plus petites peuvent également être nuisibles, en temps de sécheresse.

CONNER s'est servi pour des expériences en pots, d'un engrais commercial contenant 5 % de K_2O , 5 % de P_2O_5 (assimilable) et 2,35 % d'acide borique. Cet engrais s'est montré nuisible sur le blé à la teneur de 100 livres par acre ; mais 50 livres par acre n'ont pas été nuisibles.

Des expériences faites en *plein champ* ont confirmé ces résultats ; *l'effet du bore variant, toutefois, avec le caractère du sol.*

A la suite des cas fréquents d'intoxication des récoltes (les céréales, le coton, le tabac, etc.) par des engrais contenant du bore, on a institué aux Etats-Unis, un contrôle rigoureux des engrais chimiques et l'on a, dans ce but, établi des méthodes officielles d'analyse [7].

Un engrais est considéré comme dangereux quand il contient 0,5 % de borax anhydre [121].

En 1920, on a commencé aux Etats-Unis [31, 41] une série d'expériences en grand, pour fixer la toxicité du bore sur les récoltes. On a expérimenté sur quatre types de sol, où l'on a introduit le bore de diverses façons.

Les expériences furent faites sur le maïs, le pois, le cotonnier et la pomme de terre.

L'effet toxique s'est manifesté à la dose de 5 kg. 5 de borax par hectare ; au delà de 11 kg. par hectare l'intoxication était grave.

Les recherches faites par J.-E. BRECKENRIDGE [38] en 1921, toujours aux Etats-Unis, ont montré que la *dose nuisible* pour les *céréales* et les *haricots* est comprise entre 6 et 11 kg. de borax par hectare. Pour les *pommes de terre*, une dose de 4 à 6 kg. de borax par hectare, *augmente la récolte*, tandis que la dose de 8 à 11 kg. par hectare, diminue la proportion des tubercules et augmente celle des racines superficielles.

Ces engrais nuisibles, à cause de leur teneur considérable en borax, ont apparu aux Etats-Unis pendant la guerre, au moment même, où pour leur préparation on avait employé des sels de provenances diverses, contenant 10, 20 et 30 % de borax.

Les études de CONNER [43], ont montré que la chaux diminue l'effet toxique du borax dans le sol.

NELLER et MORSE [117] ont également constaté que la chaux ajoutée dans le sol rend le borax moins toxique pour les pommes de terre. Ils ont essayé aussi, dans le même but, l'action du gypse et du fumier, mais sans avoir obtenu des résultats concluants.

Leurs expériences ont été faites en pots, sur une terre argilo-sablonneuse avec 19,2 % d'humidité, à laquelle on a ajouté un engrais artificiel, préparé au laboratoire. A cet engrais, ils ajoutèrent ensuite des quantités variables de bore.

Parmi les plantes essayées : maïs, haricots et pomme de terre, cette dernière s'est montrée plus résistante à l'action toxique du bore que les deux autres.

CHAPITRE II

Sur la combinaison de l'acide borique avec certaines substances organiques.

La propriété que possède la glycérine et la mannite de réagir avec l'acide borique en solution, est connue depuis longtemps.

Cette réaction se traduit par une augmentation de l'acidité d'une solution aqueuse d'acide borique, quand on lui ajoute de la glycérine ou de la mannite en quantité convenable. Dans ces conditions, l'acide borique se comporte comme acide fort et fait virer l'héliantine. Cette particularité permet, par suite, son titrage en présence de cet indicateur.

Les sucres : arabinose, mannose, rhamnose, xylose, fructose, galactose, glucose, ainsi que les polyalcools : érythrite, dulcité, sorbite, se comportent de la même manière que la glycérine et la mannite. Parmi les premiers, l'un des stéréoisomères réagit plus fortement avec l'acide borique, pour provoquer ainsi, en solution aqueuse, une augmentation appréciable de la conductibilité électrique, qui est bien supérieure à celle calculée par addition (1).

On constate le même phénomène d'une augmentation de la conductibilité électrique, dans le cas des mélanges des α -oxyacides ou des α -cétoacides (l'acide pyruvique, p. ex.) avec une solution d'acide borique.

On attribue à l'acide pyruvique un rôle important dans cer-

(1) BOËSEKEN, KERSTIENS et KLAMER, *J. of the Chem. Soc.*, 1916. Abstr., i., 596.
BOËSEKEN et COUVERT, *Ibid.*, 1921. Abstr., i., 497.

tains phénomènes biologiques. C'est ainsi qu'on le considère comme un des termes intermédiaires dans la dislocation de la molécule de sucre, au cours de la fermentation alcoolique [63] ; et sa production, par voie biochimique, à partir de sucres, a été souvent observée.

D'autre part, la transformation de l'acide pyruvique en acide lactique peut être également obtenue par voie biochimique, comme d'ailleurs, la transformation de l'acide lactique en acide pyruvique [6, 103, 104].

On suppose que l'acide pyruvique intervient également dans le métabolisme et la transformation des hydrates de carbone chez les animaux (1). A ce même titre, on pourrait lui attribuer un rôle analogue chez les végétaux.

Cela nous laisse à penser, que la présence de l'acide borique dans le cas où l'acide pyruvique prend naissance, serait susceptible, dans certaines conditions, d'imposer aux phénomènes qui l'engendrent une allure particulière.

Les combinaisons de l'acide borique avec des substances contenant dans leur molécule un ou plusieurs oxhydriles, a fait l'objet d'une série de recherches, surtout de la part de J. BOËSEKEN.

Il a montré que ces combinaisons se produisent surtout avec des substances qui contiennent deux oxhydriles liés à deux atomes de carbone voisins, et situés selon la représentation stérique, du même côté et dans le même plan.

Les polyphénols qui ont deux oxhydriles en position α , se combinent aussi avec l'acide borique : c'est le cas de la pyrocatéchine et du pyrogallol.

Certaines substances organiques azotées et certains amino-acides, mises en contact, en solution aqueuse, avec l'acide borique, provoquent également une augmentation de la conductibilité électrique, qui est supérieure à la conductibilité calculée par addition.

(1) H.-C. SHERMAN, *Chemistry of Food and Nutrition*. Seconde édition, 1918, p. 108-114, et P. WORINGER, *La dégradation des acides gras dans l'organisme animal* (Bull. de la Soc. Chim. Biol., 1921, t. 3, p. 373).

Il était nécessaire de consacrer ces quelques lignes à cette propriété qu'a l'acide borique d'entrer en combinaison avec des substances possédant un ou plusieurs oxyhydriles. En effet, au cours de ce travail, j'ai dû employer à maintes reprises, des milieux de cultures contenant comme source de carbone : de la mannite, du glucose ou des polysaccharides, susceptibles de se dédoubler en sucres simples, sous l'action des microbes qu'on y cultivait. De même, certains liquides naturels (comme l'urine p. ex.) doivent aussi contenir des substances qui possèdent cette propriété de se combiner avec l'acide borique.

Dans ces conditions, l'acide borique se trouvant dans le milieu de culture en présence d'une substance avec laquelle son acidité s'exalte, il cesse d'être un acide faible. Dans un milieu, contenant à la fois de la mannite ou du glucose, par exemple et de l'acide borique, il est nécessaire, avant tout ensemencement, de neutraliser l'acidité qui s'y est développée et en particulier, dans le cas où l'on expérimente avec des doses plus appréciables de cet acide.

La réaction du milieu étant mise de côté, soit qu'on ait au préalable effectué la neutralisation de l'acidité développée, soit que la quantité d'acide borique mise en jeu soit par trop faible pour nécessiter l'addition d'alcali, il faut tenir cependant compte, que, les effets constatés en dernier lieu se sont produits dans un milieu où l'acide borique était, sinon en totalité, au moins en partie combiné avec le glucose ou la mannite. J'ai eu l'occasion de constater, au cours de ce travail, que ces différences d'effet entre le cas de l'acide borique seul et celui de l'acide borique en présence du glucose, sont très appréciables dans certains cas.

Il serait intéressant d'étudier les différences de propriétés biochimiques, existantes entre l'acide borique et ses combinaisons avec des substances du genre de celles ci-dessus mentionnées.

A ce point de vue, CZAPEK (1) mentionne la constatation

(1) FR. CZAPEK, *Biochemie der Pflanzen*. Zweite Auflage (1913), Erster Band, p. 195.

faite par KAHLENBERG et TRUE, que les composés boromannitiques sont moins toxiques que l'acide borique seul et que l'on peut neutraliser la toxicité des solutions d'acide borique, en leur ajoutant de la mannite.

Ces combinaisons de l'acide borique avec le glucose ou le sucre interverti, ont été pour moi, dans mon travail, une source de très grands obstacles.

Cette difficulté, sur laquelle j'ai insisté, ne m'a pas permis, de réaliser certaines expériences d'une manière aussi irréprochable que je l'aurais désiré, et, m'a souvent plongé dans un grand embarras pour interpréter certains résultats, ou faire nettement la part qui revient au bore seul, dans les effets constatés sur des milieux contenant ces substances, ou d'autres semblables.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIER CHAPITRE.

Plan général de mon étude et exposé des méthodes de travail employées. — L'hypothèse de l'excitation toxique. — Produits et matériel employés au cours de mes recherches.

Dans cette étude, j'ai essayé de préciser l'influence du bore sur la *fermentation de l'urée*, sur l'*ammonisation* de la caséine et de la peptone, sur la *fermentation nitrique* et *nitreuse* et sur les *microbes fixateurs d'azote* (le *Bacillus radicicola* — de la vesce et du pois — l'*Azotobacter chroococcum* et le *Clostridium Pastorianum*).

A part les fermentations nitreuse et nitrique, qui ont été étudiées avec des cultures de microbes provenant de la terre et seulement partiellement purifiées, toutes les autres ont été étudiées avec des microbes en cultures pures. Le *Bacillus radicicola* a été isolé des nodosités des légumineuses et les autres espèces ont été isolées de la terre du jardin de l'Institut Pasteur.

J'ai toujours employé le *Clostridium Pastorianum* associé à son petit compagnon aérobie (β).

Pour la plupart des microbes étudiés, j'ai également essayé de déterminer d'une manière approximative, la concentration en bore qui arrête complètement leur activité. C'est le caractère antiseptique de l'acide borique, qui m'a engagé à m'attarder à cette étude.

Au point de vue de la pratique agricole, ce fait ne manque

pas d'intérêt, étant donné l'emploi de l'acide borique et du bore comme larvicides dans le fumier. Les discussions qui s'engagèrent au sujet du rôle parfois néfaste du bore sur les récoltes, sont encore une preuve de l'intérêt que l'on porte à cette question.

* * *

Avant d'entrer dans l'exposé de mon travail, je veux traiter, en quelques mots, une question de principe relative à l'*action stimulante qu'offrent sur le développement des végétaux, certaines substances toxiques, à faibles doses*,

A la suite des recherches étendues faites par PFEFFER, HUEPPE⁽¹⁾ a formulé, en 1896, une loi biologique, également exprimée par ARNDT⁽²⁾, mais sous une forme un peu différente.

D'après cette loi, chaque corps, qui, à une certaine concentration tue le protoplasme, arrête son fonctionnement pour des concentrations moindres, et, joue le rôle d'excitant pour des doses encore plus faibles⁽³⁾.

A cette loi de l'*excitation toxique*, M. GABR. BERTRAND appose une *conception physiologique*. Pour lui, le caractère toxique d'une substance ne permet pas de poser en principe que cette substance est stimulante à faibles doses. Ce n'est que son utilité au point de vue physiologique qui lui confère cette propriété.

Nous citerons deux exemples permettant de mieux comprendre cette manière de voir.

RAULIN, dans ses recherches sur les éléments utiles et nuisibles pour l'*Aspergillus niger*, avait constaté que le *nitrate d'argent* empêche le développement de cette moisissure à une concentration de 1/1.600.000.

M. GABR. BERTRAND [26] a essayé sur des cultures d'*Aspergillus niger* l'effet des dilutions de nitrate d'argent encore plus

(1) « Jeder Körper, der in bestimmten Konzentrationen Protoplasma tötet, « in geringer Menge die Entwicklungsfähigkeit aufhebt, in noch geringeren « Mengen umgekehrt als Reiz wirkt und die Lebesseigenschaften erhöht » (Cité d'après FR. CZAPEK, *Biochemie der Pflanzen*, Erster Band, II, Aufl. 1913, p. 164).

(2) « Schwache Reize fachen die Lebenstätigkeit an, mittelstärke fördern sie, sterkste heben sie auf » (Cité d'après EDWIN BROWN, Fred. voir [65] bibl.).

faibles. En descendant jusqu'à la dose infiniment faible de $M/10^{22}$, il a constaté que le nitrate d'argent, quoique toxique pour la moisissure, n'exerce d'action stimulante sur son développement, à aucune dose au-dessous de celle qui représente la limite de sa toxicité ($M/10^6$).

En opposition à cette constatation, ce savant [20, 21] fait remarquer que le *sulfate de manganèse* manifeste son action stimulante envers l'*Aspergillus niger*, même à la dose infinitésimale de $1/10.000.000.000$.

Il faut donc penser, que ce n'est pas le *caractère toxique* d'une substance qui lui fait jouer à faibles doses le rôle d'*excitant de la matière vivante*, mais, que c'est sa valeur en tant qu'*élément normal, biogénétique*, du protoplasme qui lui confère cette propriété.

Dans les deux exemples cités plus haut, seul le *manganèse* qui remplit un rôle *essentiel dans les ferments oxydants*, ainsi que l'a prouvé M. GABR. BERTRAND pour la *laccase*, joue à faible dose le rôle d'*excitant*.

A cette manière de voir, se rattachent aussi les conclusions tirées des recherches faites par M. M. JAVILLIER [85, 86]. Ce savant, après avoir montré la présence constante du *zinc* chez les végétaux et manifesté son influence sur la croissance de certains d'entre eux, a admis que le *zinc est un élément physiologique*, susceptible de remplir un rôle *biogénétique*.

Depuis, M. GABR. BERTRAND [27, 30], en collaboration avec VLADESCO [151] d'abord et avec BENZON ensuite, après avoir montré la présence constante du *zinc* chez les animaux, a essayé de préciser le rôle de cet élément dans l'organisme.

M. DÉLÉZENNE [57] avait précédemment trouvé le *zinc* dans le *venin des serpents* et avait démontré son importance.

Ainsi, en qualité d'*élément normal* des êtres vivants, le *zinc* est appelé à jouer un rôle *favorisant* et cela à doses très faibles ($1/100.000$ du milieu de culture pour l'*Aspergillus* d'après RAULIN, ($1/50.000.000$ et moins encore d'après JAVILLIER).

Presque toutes les expériences que j'ai faites, dans le but annoncé au commencement de ce chapitre, ont été effectuées avec les microbes cultivés sur les milieux liquides appropriés. Parfois, j'ai employé de la terre stérilisée.

Etant donné l'action stimulante de *Thumus* sur certains microbes du sol, j'ai également employé pour cette étude des milieux de culture qui contenaient cette substance.

Dans la confection des milieux, j'ai toujours employé le même lot de produits chimiques, dont j'avais fait, dès le début, une provision suffisante, le même gélose, la même peptone.

La caséine a été extraite du lait et purifiée par trois précipitations de sa solution ammoniacale.

L'urée, le saccharose (1), le borax, l'acide borique, l'acide citrique ont été recristallisés. Le carbonate de calcium et le carbonate de magnésium reprécipités ; il en est de même pour les carbonates de sodium et de potassium qui ont été dissous et précipités à l'état de bicarbonates par un courant de CO_2 . Le glucose employé, était un produit pur de la maison « POULENC ». La dextrine, une dextrine blanche, commerciale.

Les autres substances qui n'entrent qu'en faibles quantités dans la préparation des milieux, étaient des produits chimiquement purs.

L'eau, qui servit à la préparation des milieux, était de l'eau redistillée sous pression réduite, dans un appareil de verre.

(1) Pour purifier le saccharose, j'en ai dissous dans une capsule environ 60 gr., dans 40 cc. d'eau redistillée et j'ai concentré en sirop.

Au sirop refroidi, j'ai ajouté — en agitant le contenu de la capsule avec une baguette — 25 cc. d'alcool méthylique purifié, exempt de bore. Presque immédiatement j'ai obtenu le saccharose précipité en poudre fine, cristallisée, que j'ai ensuite essoré à la trompe et lavé avec de l'alcool méthylique.

Après dessiccation à l'air, les cristaux furent laissés dans le vide, afin de les débarrasser complètement de l'alcool méthylique.

En procédant ainsi, j'ai suivi le procédé employé par M. GABR. BERTRAND dans une de ses recherches [20], avec cette différence, que je me suis servi de l'alcool méthylique en place de l'alcoole éthylique employé par ce savant.

Je n'ai pas pu employer l'alcool éthylique pour purifier le saccharose en vue de mes recherches, car, ce dernier contient toujours du bore, dont il est presque impossible de le débarrasser.

L'alcool méthylique dont je me suis servi, était celui que j'avais soigneusement privé de bore, en vue du dosage de ce métalloïde d'après la méthode de M. GABR. BERTRAND et AGULHON [25].

Etant donné qu'il s'agissait d'essayer l'influence de très faibles doses de bore (un millième de milligramme pour cent c. c. et même au-dessous) *j'ai examiné plusieurs sortes de verre*, afin de voir, si, par stérilisation à l'autoclave, elles ne cèdent pas du bore aux milieux de culture.

Ces essais ont porté sur le verre de Bohème (Kavalier), le verre « France », le verre d'Jena et un verre vert, dont j'avais une cinquantaine de matras de 60 cc. environ.

A cet effet, j'ai chauffé à l'autoclave, à 120°, pendant vingt minutes, les matras de ces différents verres, contenant de l'eau redistillée, faiblement alcalinisée (4 cc. d'une solution de soude normale pour 1 litre d'eau redistillée).

Des quatre sortes de verre que j'ai ainsi examinées, le verre d'Jena, seul, a cédé du bore au liquide.

Un matras de 250 cc. capacité, fait en ce verre, contenant 35 cc. d'eau alcalinisée, a cédé au liquide de 0 mgr. 010 de bore (c'est-à-dire 0 mgr. 030 de bore pour 100 cc.).

Les trois autres sortes de verre, essayées dans des conditions identiques, n'ont abandonné au liquide aucune trace de bore.

Cette constatation m'a obligé de bannir de mes expériences les récipients en verre d'Jena.

J'ai le plus souvent employé le verre « France » et quelquefois le verre de Bohème (Kavalier) et le verre vert.

Le bore mis en expérience était ajouté sous forme de solution d'acide borique, de borax, ou encore d'une solution de ces deux substances réunies, présentant une réaction neutre envers le rouge neutre. Ce mélange était composé de neuf parties d'une solution d'acide borique (contenant 500 mgr. de bore pour cent) et d'une partie d'une solution de borax, ayant la même teneur en bore. Le mélange, lui-même, contenait donc 500 mgr. de bore pour 100, c'est-à-dire 5 mgr. de bore pour 1 cc.

J'ai préparé cinq concentrations différentes de chacune de ces trois sortes de solutions : à 0.1 mgr., à 1 mgr., à 10 mgr., à 100 mgr. et à 500 mgr. de bore pour cent cc.

Les solutions stérilisées, étaient *ajoutées aseptiquement*, en

quantités convenables, au contenu stérilisé de chaque matras. J'ai ainsi procédé, afin de ne pas favoriser par le chauffage à haute température, la combinaison possible du bore avec certaines substances du milieu.

D'un autre côté, je craignais des modifications dans le milieu de culture, soit par l'alcalinité du borax (le cas de l'urée, par exemple) soit par l'acidité de l'acide borique (hydrolise du saccharose).

Pour que le milieu de culture ne soit pas dilué par les solutions de bore (et parfois par celle de soude) introduites en quantités variables, j'ai toujours eu le soin de le préparer un peu plus concentré. Ainsi, en appelant : *a*, le plus grand nombre de cc. de solution boriquée que j'étais obligé d'ajouter pour avoir la dose la plus concentrée de bore, le milieu de culture était préparé de telle façon, que les substances nécessaires pour 100 cc., se trouvaient dissoutes dans (100-*a*) cc. de solution. Le volume était ensuite complété à 100 cc., après la stérilisation du milieu, soit avec de l'eau distillée stérilisée (dans l'essai sans bore), soit avec la solution boriquée (pour les essais qui en contenaient *a* cc.), au avec un mélange de cette solution et de l'eau, pour les autres essais.

Dans mes expériences, la teneur en bore a toujours été exprimée en métalloïde. Pour avoir la teneur en acide borique, il suffit de multiplier les nombres qui la représente, par 5,63.

Chaque essai, dans les expériences que j'ai faites, a toujours été répété deux fois ; parfois trois et même quatre fois.

Le bore [25], de même que le glucose⁽¹⁾, ont été dosés d'après les méthodes, bien connues de M. GABR. BERTRAND.

L'azote, fut dosé par la méthode de KJELDAHL, en me servant pour distiller l'ammoniac de l'appareil d'AUBIN et comme indicateur pour titrer, de l'alizarine sulfonate de sodium.

Un dosage à blanc, fait au préalable, m'a toujours renseigné sur la teneur en azote des substances employées. La quantité

(1) GABR. BERTRAND et P. THOMAS, *Guide pour les manipulations de Chimie Biologique*, III^e Ed. 1919, Paris.

d'azote ainsi trouvée, et qui ne dépassait guère 0 mgr. 4 pour la quantité totale des substances employées dans un dosage d'azote d'après KJELDAHL, a été déduite à la fin de chaque dosage.

CHAPITRE II.

Considérations générales sur la production de l'ammoniaque dans le sol.

Les microorganismes du sol et les plantes, tirent leur nourriture azotée presque exclusivement des débris animaux et végétaux qu'ils y rencontrent ; mais, seuls les microorganismes (bactéries, levures, moisissures) peuvent s'en servir directement. Sous leur action, les substances protéiques et en général les substances organiques azotées, se simplifient, le terme ultime de cette dégradation étant, au point de vue azote, l'ammoniaque et parfois, même, l'azote libre.

Cette simplification de la molécule organique s'accomplit dans le sol par des étapes successives, auxquelles concourent une série de microorganismes. L'activité de ces microbes est au début fonction des conditions locales où ils se trouvent.

Au point de vue chimique, ce sont des processus d'hydrolyse, de réduction et d'oxydation, suivies de réactions secondaires, qui peuvent apparaître entre les produits qui prennent naissance.

L'attaque de la substance protéique peut se faire par les microorganismes *anaérobies* ou par les microorganismes *aérobies*. Dans le premier cas, il y a ce que l'on appelle dans un sens restreint, *putréfaction*, et l'azote arrive, en partie, jusqu'au terme ammoniac, ou même, à l'état libre. Le reste de l'azote, se trouve dans des molécules plus ou moins complexes : acides animés, scatol, indol, ptomaïnes et diverses bases organiques.

Il y a aussi production d'acides gras et dégagement de gaz : hydrogène, hydrogène sulfuré, méthane, hydrogène phosphoré.

Dans le cas des *microorganismes aërobies*, l'attaque de la matière organique se faisant en présence de l'oxygène de l'air, les produits finaux sont ceux d'une *combustion* : NH^3 , CO^2 et eau ; puis : des sulfates et des phosphates. Dans ce cas, il y a, à proprement parler, *ammonisation*.

Une autre fermentation qui aboutit également à la production d'ammoniaque est celle de l'*urée*. Cette substance, par addition de deux molécules d'eau, se transforme en *carbonate d'ammonium*.

L'*acide urique* et l'*acide hypurique*, en se transformant d'abord en urée sous l'action des microbes, donnent finalement, eux aussi, de l'ammoniaque.

Je commencerai ce chapitre, par l'étude de la fermentation de l'urée ; cette étude, m'ayant conduit à des résultats qui se rattachent aux connaissances que je viens de rappeler brièvement dans le chapitre II de la I^{re} partie, où il s'agit des combinaisons du bore avec certaines substances organiques.

PREMIÈRE SECTION. — LA FERMENTATION DE L'URÉE

§ I. — Généralités.

Le caractère biologique de la fermentation ammoniacale de l'urine a été établi par PASTEUR [122], en 1860. Deux ans plus tard, il trouva dans le dépôt de l'urine fermentée un micro-organisme sphérique, qu'il reconnaît comme l'agent de la fermentation de l'urine. PASTEUR dénomma le microorganisme : *Torula ammoniacale*. Ce microbe fut ensuite étudié par VAN THIEGHEM et appelé, par lui, *Micrococcus ureae*.

Aujourd'hui, on sait, qu'à côté de ces microorganismes sphériques (*micrococcus*), se trouvent encore de nombreuses espèces de *bactéries*, de *bacilles* et de *moisissures*, également susceptibles de transformer l'urée en carbonate d'ammonium.

Les espèces les plus actives sont les bactéries sporulées. L'*Urobacillus Pasteurii*, par exemple, peut décomposer jusqu'à 3 gr. 3 d'urée par litre et par heure (BEIJERINCK).

Citons encore : *Urobacillus Duclauxii*, *Urobacillus van Tieghenii*, *Urobacillus Miquelii*, *Urobacillus Freudenreichii*, *Planosarcina Beijerinckii*, etc.

Les températures optima de ces microbes sont comprises entre 33° et 40°. Certains sont encore actifs à 12° et à 10°.

La plupart se contentent de faibles quantités de substances minérales et organiques.

On les isole en les cultivant sur du bouillon de peptone, additionné de 2 % d'urée et solidifié par de la gélatine. Assez souvent les colonies sont reconnaissables à une auréole de cristaux de phosphate de calcium qui les entoure.

Les microbes de l'urée sont très répandus dans la nature.

On les trouve dans la terre, dans l'air et dans les eaux.

La terre arable contient, dans ses couches supérieures, des ferments de l'urée, 1 à 2 % des germes totaux. Dans le fumier et le purin, ces espèces représentent 10 % de la flore microbienne.

Tous ces microbes transforment l'urée en carbonate d'ammonium à l'aide d'une *diastase* dont l'existence a été révélée en 1876, par MUSCULUS. Elle fut ensuite préparée et étudiée par MIQUEL, qui lui a donné le nom d'« urase », changé ensuite en celui d'*uréase*.

Cette diastase est très sensible aux antiseptiques. L'acide borique la gêne fortement : une concentration de 0gr. 2 par litre, diminue son activité de 79 % (1).

L'action antiseptique de l'acide borique sur les microbes de l'urée s'exerce dans les proportions suivantes (2) : *LUrobacillus Pasteurii* est tué dans bouillon par 1/300 d'acide borique ; *Urobacillus Duclauxii* cesse de se développer en présence de 1/100 d'acide borique ; *Urobacillus Freudenreichii* ne produit pas de fermentation quand il y a 1/200 d'acide borique ; *Uro-*

(1) EPPFRONT, J., *Biochem. Catal. in Life and Industry*, First Ed. (1917), p. 549.

(2) LAFAR, FR., *Handbuch. der Techn. Mykologie* (1904-1906). Bd. III, p. 74-81.

bacillus Madoxii, *Urobacillus Schutzenbergii*, *Urosarcina Hansenii*, ne se développent pas en présence de : 1/100, 1/800 et 1/400 d'acide borique.

Pour le chlorure mercurique, les doses de toxicité sont comprises entre 1/70.000 (*Urob. Schutzenbergii*) et 1/5.000 (*Urobac. Madoxii*).

Pour le phénol, les doses toxiques varient entre les limites : 1/200 (*Urobac. Madoxii*) et 1/20 (*Urobac. Duclauxii*).

Les chiffres précédents montrent nettement, que pour tous ces microbes de l'urée, l'acide borique est plus toxique que le phénol, tout en restant bien au-dessous du chlorure mercurique.

Le fait que l'acide borique est plus toxique que le phénol sur les microbes de l'urée, a d'ailleurs été constaté par PASTEUR lui-même [125], dans le cas du *Micrococcus ureae*. « Chose étrange, » dit PASTEUR, « l'acide phénique est presque sans « action pour combattre la vie du ferment ; mais, nous avons « reconnu que l'acide borique paraît très propre à empêcher « le développement de ce petit organisme. »

§ II. — Plan de travail et conditions d'expériences.

Le microbe que j'ai employé dans ces recherches, est un *bacille sporogène*, isolé de la terre du jardin de l'Institut Pasteur.

Il se présente sous la forme de bâtonnets, a les bouts arrondis et est deux à trois fois plus long que large. Certains ont une forme ovale ; d'autres sont plus allongés ; mais, comme ces derniers sont très peu nombreux, la préparation présente au microscope un aspect uniforme.

Cultivés sur gélose, ces microbes se présentent toujours en amas de cellules, jamais sous la forme de chaînes.

Pour les cultiver, j'ai préféré à employer un milieu plus dilué préparé en dissolvant dans l'eau redistillée (environ 3/4 de litre) : 5 gr. de peptone « Chateaut », 0 gr. 250 de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$, 0 gr. 250 de SO_4Mg cristallisé. La solution

ainsi préparée était faiblement alcalinisée par quelques gouttes de soude normale et ensuite chauffée à l'autoclave à 110° pendant cinq minutes. Le liquide encore chaud, était filtré et après refroidissement on lui ajoutait 20 gr. d'urée et on complétait au litre avec de l'eau redistillée.

Ensemencée dans ce milieu, l'espèce précédemment décrite pousse très bien. Après 24 heures le liquide se trouble, et, avant même 40 heures, sans qu'il se soit produit de sédimentation complète, les cultures s'éclaircissent dans la couche supérieure.

Après 40 à 44 heures d'ensemencement, j'ai obtenu la transformation de 50 % d'urée en carbonate d'ammonium ; taux, qui monta à 70 %, après 3 jours.

Les vases, dont je me suis servi, étaient de petits matras de 60 cc. de capacité, en verre vert. Dans une seule série d'expériences, j'ai employé des matras de 90 cc., en verre « France ».

La peptone contenait 1/1.000 mg. de bore, pour les 500 mg. dissous dans 100 cc. de bouillon.

L'urée a été purifiée par recristallisation.

Le milieu de culture ne contenait donc, pas plus de 1/1.000^{mg.} de bore pour 100 cc.

Les souches des microbes étaient cultivées sur milieu gélosé à 2 %, additionné toujours de 2 % d'urée. Cette fois, le milieu avait la composition suivante : 2 % de peptone, 0.1 % de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ et 0.1 % de SO_4Mg crist.

Pour l'ensemencement du bouillon, j'ai toujours employé les cultures sur gélose, âgées de trois à quatre jours.

Dans ce but, j'avais soin de délayer quatre petites anses du fil de platine dans un matras contenant 20 cc. de bouillon stérilisé, sans urée.

Dans ce matras, j'avais au préalable placé quelques morceaux de tube de verre cassé. Par agitation, ces morceaux de verre dilaceraient les amas de microbes et, l'on avait ainsi, une suspension de microbes homogène, aussi fine que possible.

J'employais pour l'ensemencement des matras, deux, ou quatre gouttes, de cette suspension, suivant le cas.

Le milieu de culture, dont j'ai précédemment indiqué la préparation, était réparti par portion de 20 cc., exactement mesu-

rés, dans des matras stérilisés de 60 ou de 90 cc. et stérilisés ensuite à l'autoclave, pendant un quart d'heure, à 110°.

La stérilisation provoquait la transformation d'une petite quantité d'urée en carbonate d'ammonium. Les 400 mgr. d'urée (contenus dans 20 cc. de milieu), correspondant à 227 mgr. d'ammoniac, donnaient par chauffage à l'autoclave, dans les conditions de stérilisation mentionnées, de 9.5 mgr. à 12.5 mgr. d'ammoniaque.

A chaque série d'expérience, les matras avec le bouillon étaient stérilisés tous à la fois, dans un grand autoclave. De cette façon, la même quantité d'ammoniaque se formait dans tous les matras. Cette quantité d'ammoniaque, était déterminée à la fin de l'expérience dans un matras témoin, non ensemencé, qui avait séjourné au thermostat dans les mêmes conditions que les autres matras ensemencés et déduite des quantités d'ammoniaque trouvées à l'analyse.

Les cultures ont été maintenues à 27°, dans une chambre thermostat.

Les résultats obtenus sont présentés dans des tableaux, où sont envisagées également les particularités propres à chaque expérience.

Pour arrêter la fermentation, je n'ai pas eu recours à la chaleur, afin d'éviter les pertes d'ammoniaque. Il m'a semblé préférable d'ajouter dans chaque matras, après la neutralisation de son contenu, 2 cc. d'acide sulfurique deux fois normal.

En attendant l'analyse, les matras étaient conservés dans la glacière.

Pour le dosage de l'ammoniaque, j'ai procédé de la façon suivante : Le contenu de chaque matras était transvasé dans un ballon jaugé et complété à 50 cc. avec les eaux de lavage. Je prélevais ensuite 10 cc. de cette solution, que je diluais avec 200 cc. d'eau distillée, dans un ballon d'un litre. J'ajoutais 0,5 gr. de magnésie calcinée et je distillais dans l'appareil d'AUBIN, en recueillant 50 cc. de distillat dans 10 cc. d'acide sulfurique $n/5$. L'excès d'acide était titré en retour avec de la soude $n/5$.

Des expériences ont été faites en 1921 avec le microbe récemment isolé; d'autres semblables, ont été répétées en 1922, avec des souches du même microbe, à 15 mois d'intervalle...

Le microbe était repiqué de temps en temps, toujours sur le même milieu, préparé avec les mêmes substances.

* * *

Dans la suite de mes recherches sur l'influence du bore sur les microbes du sol, j'ai dû envisager le cas, où, j'aurai à cultiver des microbes sur *des milieux contenant de la mannite ou du glucose*.

En effet, la mannite ou le glucose, de même que la plupart des substances contenant, dans leur molécule plusieurs oxydriles alcooliques, se combinent avec l'acide borique. Cette combinaison se manifeste par une augmentation de l'acidité, ainsi que je l'ai mentionné dans un chapitre précédent.

En raison de ce fait, je me suis demandé, si, dans ces conditions, le bore, ne se comporterait pas autrement que dans le cas où il est à l'état d'acide borique ou de borax.

A cet effet, disposant d'un microbe doué d'une grande sensibilité au bore et n'attaquant pas le glucosé, j'ai songé à étudier l'action de l'acide borique sur la fermentation de l'urée en présence de glucose : J'ai employé une teneur en glucose de 2 %, qui est la dose généralement utilisée pour la préparation des milieux de culture, dans les cas qui m'intéressaient.

J'ai toujours employé le même milieu à 0.5 % de peptone et à 2 % d'urée, auquel j'ajoutais le glucose à la concentration indiquée.

Pour déterminer approximativement la quantité de soude nécessaire à la neutralisation de l'acidité développée par diverses concentrations de bore, j'ai fait un essai préalable dans de petits tubes à essai, tous de mêmes dimensions.

Dans chacun de ces tubes j'ai mis 5 cc. d'une solution de 2% de glucosé dans l'eau redistillée et des quantités variables d'acide borique. La teneur d'acide borique était comprise entre des limites correspondant à 0 mgr. 005 et 100 mgr. % de bore. A côté, il y avait un témoin sans bore.

En même temps, j'effectuai une autre série de détermina-

tions, dans des tubes semblables, de même calibre, qui ne contenaient que des solutions d'acide borique.

Comme indicateur, je me suis servi du *rouge neutre* : trois gouttes par tube, d'une solution à 0.1 %.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dans la série sans glucose, c'est à partir de 2 mgr. 5 % de bore que j'ai constaté une augmentation d'acidité, tandis que dans la série avec glucose, celle-ci, se manifestait déjà nettement, à partir de 0 mgr. 1 % de bore.

En ajoutant une seule goutte (0 cc. 3) de soude $n/50$ dans chaque tube, les différences d'acidité apparaissent plus marquées. Ainsi, dans la série sans glucose, toutes les solutions virent à l'alcalinité jusqu'à celle à 2 mgr. 5 % de bore, qui, elle, vire légèrement vers l'acidité.

Dans la série avec glucose, le témoin et la solution à 0 mgr. 1 % de bore seuls, deviennent jaunes. La solution à 0 mgr. 5 % de bore, a une teinte d'acidité assez nette, correspondant à la solution à 10 mgr. % de bore de la série sans glucose. Et la solution à 10 mgr. % de bore, de la série avec glucose, a la même teinte que la solution à 20 mgr. % de bore, de la série sans glucose.

Comme conclusions, j'ai trouvé qu'il faut ajouter, pour les cinq cc. de liquide, approximativement les quantités suivantes de soude, afin de neutraliser les diverses doses d'acide borique, en présence de 2 % de glucose.

B(OH) ³ (bore, mg %) :	0,5	1	2,5	5
Sol. de soude (cc.) :	0,05 $n/50$	0,1 $n/50$	0,2 $n/50$	0,08 $n/10$
B(OH) ³ (bore, mg %) :	10	20	50	100
Sol. de soude (cc.) :	0,15 $n/10$	0,15 $n/5$	0,25 $n/5$	0,45 $n/5$

A partir de 20 mgr. % de bore, le virage est moins net.

Dans la série des solutions d'acide borique *sans glucose*, on fait virer à l'alcalinité avec 0 cc. 25 de soude $n/10$, les cinq cc. de la solution la plus concentrée (à 100 mgr. % de bore).

Des recherches que j'ai faites, avec les mêmes concentrations

d'acide borique, en présence de 3 % de glucose, en vue des expériences à faire sur le *Clostridium Pastorianum*, m'ont donné des résultats du même ordre pour la quantité de soude nécessaire à la neutralisation de l'acidité.

Dans mes expériences, j'ai corrigé l'acidité à partir de 1 mgr. % de bore. Ainsi, pour 20 cc. de milieu, j'ai ajouté les quantités suivantes de soude :

Sol. de soude (cc.) :	0,1 n/10	0,1 n/5	0,15 n/5	0,3 n/5
pour				
Bore, mg. % :	1	2,5	5	10
Sol. de soude (cc.) :	0,1 n/1	0,2 n/1	0,4 n/1	
pour				
Bore, mg. % :	20	50	100	

Ici, également, les solutions d'acide borique et les solutions de soude furent stérilisées à part.

§ III. — Expériences.

I. — EXPÉRIENCE faite au mois de mars 1921, avec le *microbe de l'urée en culture pure*, sur milieu synthétique à 2 % d'urée.

Des matras en verre vert de 60 cc., contenant 20 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique. Durée de l'expérience : 46 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	107.8	0.010	117.0	1	69.0
»	104.4	»	112.9	»	71.1
0.0005	107.8	0.050	108.8	2.5	45.6
»	109.5	»	108.8	»	42.5
0.001	110.9	0.100	106.8	5	17.0
»	112.9	»	103.7	»	20.1
0.005	112.9	0.500	85.4		
»	113.6	»	82.3		

II. — EXPÉRIENCE faite au mois de mars 1921, dans les mêmes conditions que la précédente.

Le bore a été ajouté à l'état de borax. Durée de l'expérience : 42 heures.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	100.3	0.010	105.4	1	76.9
»	103.4	»	101.4	»	74.8
0.0005	106.5	0.050	104.4	2.5	54.4
»	106.5	»	104.4	»	50.4
0.001	106.5	0.100	96.3	5	21.8
»	104.4	»	99.3	»	22.8
0.005	111.6	0.500	85.0		
»	115.6	»	83.0		

III. — EXPÉRIENCE faite le 28 avril 1921, avec le *microbe de l'urée en culture pure*, sur de la *terre stérilisée*.

On a mis 20 gr. de terre de jardin (1), séchée à l'air, dans des tubes à essai et on a stérilisé pendant 2 h. 1/2 à 120°. On a ensuite ajouté, en laissant s'infiltrer, 5 cc. de milieu synthétique à 2 % d'urée, contenant des quantités variables de bore et deux gouttes d'une suspension de *microbe* en culture pure. Le milieu liquide, ainsi que les solutions d'acide borique, avaient été stérilisés au préalable. Durée de l'expérience : 48 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc. de liq. ajouté	Bore mg. % gr. de terre	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc. de liq. ajouté	Bore mg. % gr. de terre	Ammoniac (mg.) produit
0	0	7,7	0,100	0,025	13,8
»	»	8,8	»	»	11,9
»	»	6,8	0,500	0,125	12,9
»	»	8,7	»	»	12,6
0,001	0,0002	9,4	1	0,250	9,0
»	»	11,2	»	»	8,8
0,005	0,0012	10,4	2,5	0,615	5,4
»	»	11,2	»	»	6,6
0,010	0,0025	11,6	5	1,25	1,5
»	»	10,4	»	»	3,6
0,050	0,0125	14,6	10	2,5	0
»	»	12,9	»	»	»

(1) J'ai préparé un *extrait aqueux* de cette terre, en agitant de temps en temps, pendant une heure, à 27°, un mélange de 20 gr. de terre et 100 cc. d'eau redistillée. Après *centrifugation*, j'ai pris 5 cc. du liquide clair, où, après

IV. — EXPÉRIENCE faite le 19 mai 1921, avec le *microbe de l'urée en culture pure*, sur milieu synthétique à 2 % d'urée, additionnée de 2 % de glucose.

Des matras en verre vert de 60 cc. de capacité, contenant 20 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique. Durée de l'expérience : 46 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	104,3	0,010	110,2	1	100,0
»	105,1	»	106,0	»	100,0
0,0005	97,5	0,050	107,7	2,5	93,2
»	100,9	»	103,4	»	94,9
0,001	100,9	0,100	106,8	5	76,2
»	101,7	»	104,3	»	76,2
0,005	103,4	0,500	106,0	10	54,1
»	106,8	»	105,1	»	57,5

OBSERVATIONS. — En présence du glucose la toxicité de l'acide borique est considérablement atténuée.

V. — EXPÉRIENCE faite le 6 juin 1922, avec le *microbe de l'urée en culture pure* (le même qui a servi aux expériences de l'année dernière), sur milieu synthétique à 2 % de l'urée.

20 cc. de ce milieu ont été distribués dans de petits matras en verre « France » de 90 cc. de capacité. Le bore a été ajouté à l'état d'une solution contenant à la fois de l'acide borique (9 vol.) et de borax (1 vol.) (1). Durée de l'expérience : 72 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
—	—	—	—
0	82,3	0,050	80,6
»	87,4	»	84,0
0,001	89,1	0,100	61,9
»	84,0	»	65,3
0,005	82,3	0,500	41,5
»	85,7	»	33,0
0,010	84,9	1	27,0
»	85,7	»	—

Évaporation de la solution alcalinisée et incinération, j'ai dosé le bore. Il y avait 0 mg. 025 de bore par 100 cc. d'extrait, ce qui fait 1 mg. 25 de bore (= 7 mg. d'acide borique) cédé par 1 kg. de terre dans ces conditions.

(1) Les solutions d'acide borique et de borax qui ont été mélangées avaient la même teneur de 500 mg. de bore pour 100 cc. (Voir à la p. 41).

VI. — EXPÉRIENCE faite le 6 juin 1922, en même temps que la précédente, sur milieu synthétique à 2 % d'urée.

Des matras en verre vert de 60 cc., contenant 20 cc. de milieu. Le bore a été ajouté sous la forme d'une solution d'acide borique et de borax. Durée de l'expérience : 43 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	84,2	1	36,9	10	2,6
»	99,0	2,5	11,9	»	2,6
0,500	52,7	»	13,6	20	0
»	44,4	5	2,6	»	»
1	33,3	»	2,6		

OBSERVATIONS. — Cette expérience qui a eu pour but de fixer la dose à partir de laquelle l'acide borique devient toxique pour le microbe, a été faite dans deux séries de matras d'inégale grandeur. Toutefois, les matras de la même série étant sensiblement semblables l'un par rapport à l'autre.

VII. — EXPÉRIENCE faite le 12 juin 192, avec le *microbe de l'urée en culture pure*, sur milieu synthétique à 2 % d'urée.

On a réparti 20 cc. de ce milieu dans de petits matras de 60 cc. en verre vert. Le bore a été ajouté sous la forme d'une solution contenant à la fois de l'acide borique (9 vol.) et du borax (1 vol.). Durée de l'expérience : 70 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	130,1	1	57,6	10	3,4
»	129,2	»	59,5	»	3,4
0,500	69,7	5	7,7	20	0
»	73,1	»	8,5	»	»

VIII. — EXPÉRIENCE faite le 20 juin 1922. *Microbe de l'urée, en culture pure*, sur milieu synthétique à 2 % d'urée et 2 % de glucose.

On a réparti 20 cc. de ce milieu dans des petits matras de 60 cc. en verre vert.

Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique. Durée de l'expérience : 74 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	128,4	1	109,7	10	3,4
»	131,8	2,5	57,8	»	3,4
0,5	117,3	»	57,0	20	0
»	119,0	5	29,8	»	»
1	105,4	»	32,3		

IX. — EXPÉRIENCE faite le 1^{er} juillet 1922, avec le *microbe de l'urée en culture pure*, sur la terre stérilisée.

20 gr. de terre de jardin, séchée à l'air, ont été stérilisés dans de petits matras où l'on a ajouté ensuite 5 cc. d'une solution stérilisée contenant 2 % d'urée et 0,025 % de phosphate bi-potassique. Cette solution contenait aussi des quantités variables de bore et on lui avait ajouté également une suspension de microbe en culture pure (deux gouttes pour les cinq cc.). Le bore a été introduit à l'état de solution contenant à la fois de l'acide borique (9 vol.) et de borax (1 vol.). L'expérience a duré du 26 juin (5 h.) jusqu'au 1^{er} juillet (10 h.). La température a été maintenue, comme toujours, à 27°.

Bore mg. p. 100 cc. de liq. ajouté	Bore mg. % gr. de terre	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Bore mg. % gr. de terre	Ammoniac (mg.) produit
0	0	21,1	0,400	0,100	27,2
»	»	25,2	2	0,500	19,6
»	»	27,2	»	»	30,6
0,020	0,005	34,0	4	1	10,2
»	»	35,5	»	»	19,0
0,040	0,010	24,5	10	2,5	0
»	»	27,9	»	»	0
0,200	0,050	31,6	20	5	0
»	»	20,2	»	»	0
0,400	0,100	28,9			

OBSERVATIONS. — I. La terre qui m'a servi dans cette expérience n'est pas la même que celle employée dans l'expérience semblable (Exp. III, page 53) faite l'année précédente. C'est un autre lot que j'ai préparé en plus grande quantité en vue des expériences à faire avec d'autres microbes.

Cette terre contenait 7,7 % d'azote.

II. J'ai dosé le bore sous deux états dans la terre que j'ai employée dans cette

expérience : le bore dans l'*extrait aqueux* et le bore soluble dans l'*acide phosphorique*, comme l'on fait dans la méthode de M. GABR. BERTRAND pour le dosage du bore.

L'*extrait aqueux* fut préparé en faisant macérer pendant 24 heures à 27° (température où j'ai effectué mes expériences) 50 gr. de terre séchée à l'air avec 50 cc. d'eau redistillée, en agitant de temps en temps. Après ces 24 heures de séjour, le liquide fut décanté et centrifugé. Dans 10 cc. (correspondant à 10 gr. de terre) j'ai dosé le bore, après alcalinisation préalable, évaporation à siccité et calcination.

Ayant procédé ainsi, j'ai trouvé pour 100 cc. d'extrait aqueux (= 100 gr. de terre) 0 mg. 025 de bore (= 0 mg. 141 d'acide borique).

Pour le dosage du bore soluble dans l'*acide phosphorique*, j'introduisais 2 gr. de terre (calcinée au préalable avec un peu de soude) dans le mélange : alcool méthylique (20 cc.) et acide phosphorique (5 cc.) et je distillais au bain-marie. La distillation finie, j'ajoutais dans le ballon encore 10 cc. d'alcool méthylique et je faisais une seconde distillation.

Ayant procédé ainsi, j'ai trouvé pour un kilog. de terre, 25 mg. de bore (= 0 gr. 141 d'acide borique) ; ce qui représente cent fois la quantité de bore qui peut être extraite de la même terre, par l'eau, dans les conditions ci-dessus mentionnées.

X. — EXPÉRIENCE a été faite sur de la terre non stérilisée.

On a pris 20 gr. de terre que l'on a mis dans des ma'ras de 60 cc., où ils ont été arrosés avec 5 cc. d'une solution d'urée contenant 2 % de cette substance et des quantités variables d'acide borique, jusqu'à une concentration de 100 mg. %.

Au bout de trois jours à 27°, on a trouvé partout la même quantité d'ammoniac (de 55 à 58 mg.) correspondant à l'hydrolise de toute la quantité d'urée ajoutée.

XI. — EXPÉRIENCE faite le 30 septembre 1922, avec le microbe de l'urée en culture pure sur l'*urine stérilisée* à 110° pendant 15 minutes, dans de petits matras de 125 cc. en verre de Bohême (Kavalier).

Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique. Durée de l'expérience : 72 heures à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	106,7	10	49,0	100	1,3
»	107,5	»	51,4		
1	90,5	20	31,9	Après cinq jours	
»	94,0	»	30,2	»	161,0
5	63,3	50	5,5	100	0,5
»	60,7	»	5,5		

OBSERVATIONS. — L'urine, de provenance humaine, que j'ai employée dans cette expérience, était une urine normale, exempte de glucose.

Les urines sont relativement riches en bore. Dans une analyse j'ai trouvé, comme bore total, 1 mg. de métalloïde (= 5 mg. 6 d'acide borique) par litre.

§ IV. — *Conclusions des expériences sur la fermentation de l'urée.*

Il résulte des recherches précédemment exposées, que le microbe de l'urée, employé dans mes expériences, est *très sensible au bore*. Cette sensibilité est *moindre pour le microbe récemment isolé* de la terre, que pour celui qui est depuis plus longtemps cultivé sur un milieu artificiel. Ainsi, tandis que le développement du premier n'est presque pas influencé pour une dose de bore de 0 mg. 1 % (en métalloïde), *le microbe de culture voit son activité diminuée de 25 % pour la même dose de bore* (1/1.000.000) (Voir les tableaux des expériences I, II, et V).

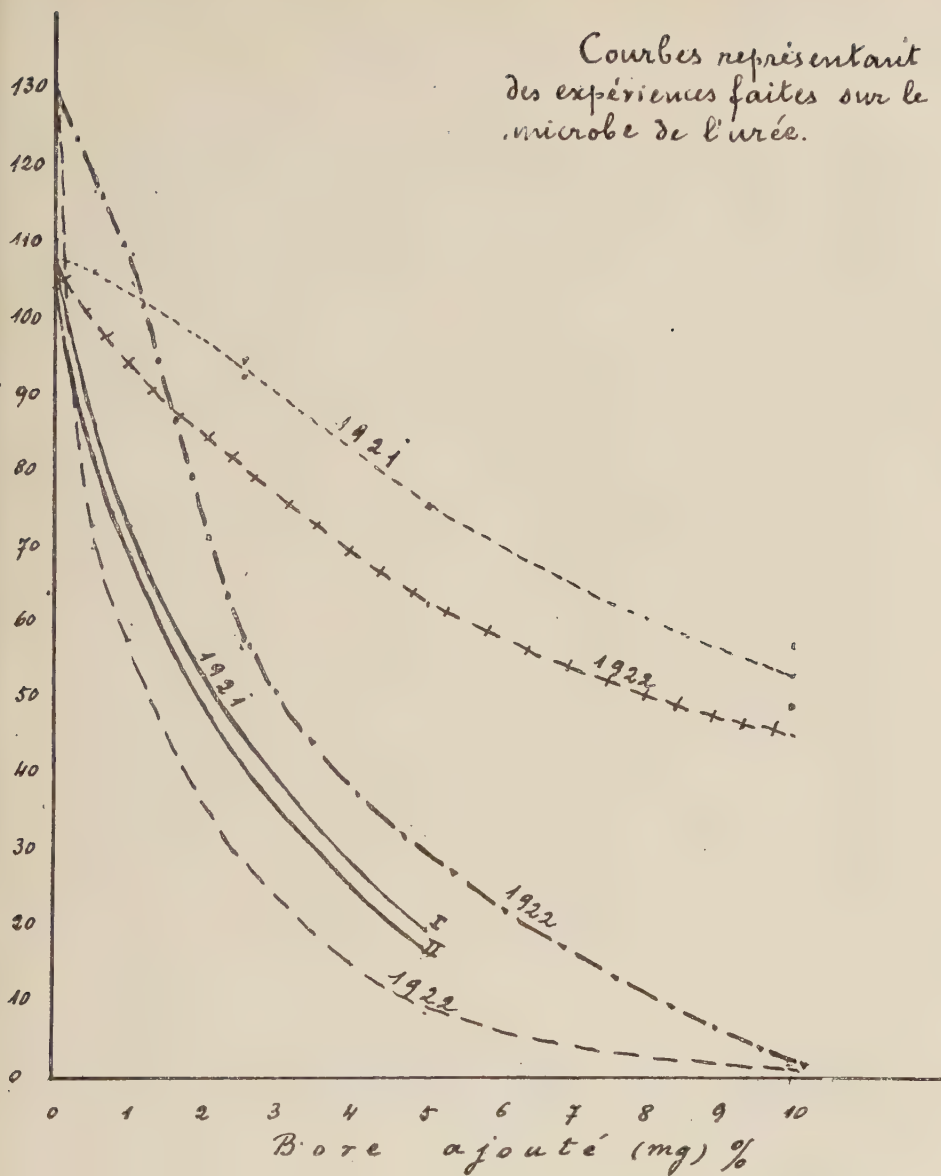
La fermentation de l'urée par le microbe que j'ai isolé, est empêchée pour des doses de bore comprises entre 1 et 2/10.000, c'est-à-dire par 0,5 gr. à 1 gr. d'acide borique par litre (Expériences VI, VII).

Dans les mêmes conditions d'expériences, la toxicité du bore est atténuée en présence de 2 % de glucose (1) (la seule concentration que j'ai essayée) ; dans ce cas, celle-ci n'a commencé à se manifester que pour une dose de bore dix fois plus forte (Expériences IV, comparée à I et II).

En examinant les tableaux des expériences I et IV on constate également, que la présence du glucose ne modifie pas

(1) Ainsi que je l'ai dit dans le chapitre II, première partie, p. 35, CZAPEK, mentionne une constatation faite par KAHLENBERG et TRUE relative à la moindre toxicité de l'acide borique en présence de la mannite. Je n'ai eu connaissance de ce fait, qu'après avoir accompli mes recherches dans un ordre d'idées semblable. Je n'ai pas pu me renseigner sur le travail de KAHLENBERG et TRUE et savoir s'ils avaient accompli des déterminations quantitatives au cours de leur étude, CZAPEK, ne donnant pas la référence bibliographique de ce travail. Je ne saurais préciser non plus, si leurs recherches ont porté sur les végétaux supérieurs ou sur les microbes.

Courbes représentant
des expériences faites sur le
microbe de l'urée.



Exp. faites en { ——— sur milieu synthétique simple
1921 avec le microbe récemment isolé. { contenant 2% de glucose

Exp. faites en { ——— sur milieu synthétique simple
1922 avec le microbe cultivé, devenu plus sensible au bore. { contenant 2% de glucose
+ + + + " l'urine.

les conditions physiologiques du fonctionnement du microbe. On voit, en effet, que la quantité d'ammoniaque produite est la même dans les essais sans bore, pour les deux séries d'expériences, pendant le même temps et dans les mêmes circonstances.

Ce fait nous conduit à admettre, que la toxicité du bore est atténuée par suite d'une combinaison de l'acide borique avec le glucose et, qu'il n'y a pas changement de sensibilité du microbe envers le bore, à cause des modifications dans les conditions d'existence.

En comparant les tableaux de l'expérience I et de l'expérience IV d'une part, et les tableaux de l'expérience VII et de l'expérience VIII d'autre part, on voit que, *plus le microbe est sensible au bore, moins la même dose de glucose est efficace pour atténuer la toxicité du métalloïde.*

Ainsi, dans les expériences faites en 1922, avec le microbe plus sensible au bore, la dose de 5 mg. % de cet élément, a, en présence de glucose, un effet toxique équivalent à celui d'une dose moitié moindre de bore (2 mg. 5 %) ajoutée à l'état d'acide borique (*Voir sur les courbes*). La dose de 10 mg. % de bore empêche la fermentation aussi bien en absence qu'en présence de glucose.

D'après les expériences faites en 1921, avec le microbe récemment isolé, donc moins sensible, la dose de 10 mg. % de bore, en présence de 2 % de glucose est loin d'être empêchante. Dans ce cas, c'est pour cette dose de 10 mg. %, que l'on constate une action comparable à celle qu'avait une dose de 2 mg. 5 de bore %, en l'absence du glucose, sur le même microbe.

L'uriné de l'homme, et fort probablement celle de certains autres animaux, doit également contenir des substances qui réagissent avec l'acide borique. En effet, *le microbe cultivé sur ce liquide est moins gêné par l'action du bore* ; il l'est même moins que sur le milieu artificiel à 2 % de glucose, où, déjà la toxicité du bore est sensiblement réduite (*Voir les tableaux des expériences XI et VIII et les courbes, p. 57 et 55*) :

Les doses de bore comprise entre 0 mg. 001 % et 0 mg. 010 ‰ c'est-à-dire ($1/1.000.000.000$ et $1/100.000.000$) semblent exercer une légère action stimulante sur la fermentation en milieu liquide synthétique (expériences I et II). Dans une expérience faite sur la terre stérilisée (page 53) cette action stimulante est encore plus apparente que dans le cas précédemment cité ; et elle persiste entre des limites plus étendues (de 0 mg. 0002 à 0 mg. 125 pour 100 gr. de terre).

La dose toxique sur la terre stérilisée, est de 2 mg. 5 de bore (= 14 mg. d'acide borique) pour 100 gr. de terre sèche. Cela revient à 10 mg. de bore pour 100 cc. de milieu liquide, car, pour avoir une teneur de 2 mg. 5 de bore % de terre sèche, il m'a fallu y ajouter 25 cc. de liquide contenant 10 mg. % de bore.

Dans la terre non stérilisée, desséchée à l'air, le bore jusqu'à la dose de 1 gr. par litre (5,6 gr. d'acide borique) de solution ajoutée, ne provoque pas de diminution de la quantité d'ammoniac formée par l'ensemble des microbes capables d'hydrolyser l'urée.

DEUXIÈME SECTION. — L'AMMONISATION

§ I. — Généralités.

Dans le sol, les microbes aérobies et anaérobies travaillent à côté les uns des autres à la dégradation des substances protéiques et des substances organiques azotées. Il n'y a que dans les couches supérieures, les mieux aérées, que les microorganismes aérobies sont susceptibles de travailler seuls. Cette transformation aérobie des matières azotées, serait l'ammonisation proprement dite.

D'après E. MARSCHAL [99] l'ammonisation serait, sous un certain rapport, le résultat d'un processus d'oxydation, chimiquement semblable à la respiration, et comparable à la formation du soufre, à partir de l'hydrogène sulfuré par les bactéries de WINOGRADSKY.

Mais, le plus souvent, les formes aérobies et les moisissures continuent l'œuvre commencée par les anaérobies, en s'attaquant aux produits plus simples formés par celles-ci.

D'après JODIR [87], deux tiers environ de l'azote organique du sol se trouvent sous forme de *monoaminoacides* ; le reste, sous forme d'*azote amidé*. On a trouvé dans le sol divers aminoacides tels que : leucine, histidine, arginine ; des bases puriques et pyrimidiques et de la créatinine.

En 1893, A. MÜNTZ et H. COUDON [113] ont montré que la terre stérilisée n'ammonise pas et on a fait ainsi la preuve, que la production de l'ammoniac dans le sol est l'œuvre exclusive des microorganismes.

E. MARSCHAL [99] a étudié ensuite (1894) la décomposition de l'albumine d'œuf, par quelques microorganismes (bactéries, levures, moisissures) en culture pure, isolés du sol. Le *Bacillus mycoïdes* s'est révélé le plus énergique de tous ces microbes. En 15 jours, à 30°, il a transformé en ammoniac 46 % de l'azote contenu dans la molécule d'albumine.

La majorité des espèces ammonisantes, ne met en liberté, sous forme d'ammoniaque, guère plus de 20 à 30 % de l'azote protéique.

Leur optimum est à 30°. Entre 0° et 5°, il n'y a formation que de traces d'ammoniaque. A 40°, les microbes ne se développent plus.

Parmi les bactéries ammonisantes les plus actives, il faut citer : *Bact. fluorescens liquefaciens*, *Bact. subtilis* et *Bact. tumescens*. *Bacillus ellenbachensis* (de l'« Alinite » de Caron) est aussi un ammonisant énergique. On a préparé un mélange de *Bac. mycoïdes* et de *Bac. ellenbachensis*, pour inoculer le sol et y intensifier la production d'ammoniaque.

Dans le sol, il faut aussi prendre en considération les moisissures et parmi celles-ci les actinomycètes.

D'une manière générale, le sucre entrave l'ammonisation des substances azotées par les microbes [4, 5.]. Dans certains cas, déjà 1 % de dextrose, dans le milieu, réduit d'un tiers la quantité d'ammoniac produit.

§ II. — Conditions d'expérience.

J'ai employé, comme substances azotées, la peptone et la caséine. Cette dernière a été extraite du lait et purifiée par trois précipitations successives de ses solutions ammoniacales.

Le milieu peptoné contenait pour 100 cc. : 1 gr. de peptone Chapoteaut, 0,1 gr. de SO^4Mg crist., 0,1 gr. de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$. Il a été faiblement alcalinisé avec de la soude.

Le milieu à caséine fut préparé d'une manière spéciale.

Dans environ $\frac{3}{4}$ de litre d'eau redistillée, j'ai dissous 4 gr. d'acide citrique cristallisé et j'y ai ajouté ensuite 2 gr. de CO^3K^2 et 1,5 gr. de CO^3Na^2 tous les deux à l'état sec. J'ai dissous aussi 1 gr. de SO^4Mg crist., 1 gr. de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ et 0,2 de CaCl_2 crist.

La caséine fut ajoutée sous forme d'une solution, en proportion de 6 gr. et, avant de compléter au litre, j'ai ajouté encore quelques cc. d'une solution normale de carbonate de soude, afin d'avoir une réaction alcaline.

Pour préparer la solution de caséine, je l'ai dissoute en la triturant dans un mortier avec un peu d'eau additionnée de quelques gouttes d'ammoniaque. Après, la solution fut diluée et bouillie sur un bain de sable pour chasser l'excès d'ammoniac (Essai au papier de tournesol).

Le milieu ainsi préparé, contenait la caséine en solution et, ayant une réaction franchement alcaline au tournesol, convenait très bien au microbe ammonisant que j'avais isolé de la terre.

100 cm^3 de ce milieu contenaient 7 mg. 5 d'ammoniac (distillé avec de la magnésie) et environ 0 mg. 001 de bore. Le milieu à la peptone avait la même teneur en bore.

Le milieu de culture a été stérilisé à 110° , pendant quinze minutes, et ensemencé soit avec de la macération de terre, soit avec le microbe ammonisant en culture pure.

Ce microbe, est un *bacille sporogène* qui pousse abondamment sur bouillon de peptone gélosé, à 27° . Sur la gélatine, en plaques, il forme des amas floconneux, comme le mycoïde.

Sur bouillon gélosé, l'aspect des cultures ressemble (en examinant à la loupe), vers les marges, aux filaments mycéliels d'une moisissure.

Ce microbe, est un bon ammonisant. Pendant deux semaines, il a mis en liberté 25 à 30 % de la quantité d'ammo-

niac correspondante à l'azote contenu dans la peptone ou dans la caséine.

Pour faire lesensemencements, j'ai d'abord préparé une suspension homogène de microbes dans quelques cc. de milieu de culture stérilisé (en procédant comme pour le microbe de l'urée), et j'ai employé ensuite, deux ou trois gouttes de cette suspension.

Le dosage de l'ammoniac a été fait par distillation avec de la magnésie calcinée, en titrant avec de l'acide sulfurique $n/5$, en présence de l'alizarine sulfonate de soude comme indicateur

§ III. — Expériences.

I. — EXPÉRIENCE faite le 18 février 1921, avec de la *macération de terre* sur milieu à 1 % de peptone.

Des matras en verre vert de 150 cc. contenant 25 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique (2^e colonne) et de borax (3^e colonne). Durée de l'expérience : 4 jours à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Ammoniac (mg.) produit
0	28,6	35,7	0,100	31,6	31,3
0,001	31,5	34,9	0,500	24,5	32,3
0,005	29,2	39,0	1	30,6	29,8
0,010	32,0	35,7	2,5	32,1	30,8
0,050	37,0	35,0	5	26,2	34,0

II. — EXPÉRIENCE faite le 3 avril 1921, avec le *microbe ammonisant en culture pure* sur milieu synthétique à 1 % de peptone.

Matras de 125 cc. en verre de Bohême (Kavalier) contenant 25 cc. de milieu. Durée de l'expérience : 15 jours à 27°. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	9,9	0,001	10,4	0,010	10,7
»	9,9	»	10,5	»	10,5
0.0005	10,2	0.005	10,4	0,050	10,0
»	10,4	»	10,5	0,100	10,0

II bis. — EXPÉRIENCE faite en même temps que la précédente et dans les mêmes conditions.

On a employé des matras en verre vert ayant une capacité de 200 cc.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	11,4	0,500	12,0	2,5	11,4
0,050	11,0	1	11,2	5	11,0
0,100	11,2	»	11,7	5	11,0
0,500	12,4	2,5	11,0		

III. — EXPÉRIENCE faite le 12 juin 1921, avec le *microbe ammonisant en culture pure*, sur milieu synthétique à la caséine (0,6 gr. %) en solution.

Des matras de 125 cc., en verre de Bohême (Kavalier), contenant 30 cc. de milieu. Le bore a été ajouté sous la forme d'une solution d'acide borique. Durée de l'expérience : 15 jours à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	12,9	0,010	13,0	1	13,0
»	13,2	»	13,0	»	—
0,0005	13,0	0,050	13,0	2,5	12,9
»	12,9	»	—	»	13,0
0,001	13,0	0,100	13,2	5	13,0
»	12,9	»	12,9	»	—
0,005	13,0	0,500	13,0	10	13,4
»	13,0	»	—	»	13,4

IV. — EXPÉRIENCE faite le 7 juillet 1922 avec le *microbe ammonisant en culture pure*, sur la terre de jardin, séchée à l'air.

20 gr. de cette terre ont été mis dans de petits matras de 90 cc., en verre « France » et après stérilisation, humectés avec 5 cc. d'une solution stérilisée contenant 1 % de caséine et 0,025 % de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$. Cette solution contenait des quantités variables de bore, ajouté sous la forme d'une solution d'acide borique

Voici

(9 p.) et de borax (1 p.) et deux gouttes d'une suspension microbienne. Durée de l'expérience : 8 jours à 27°.

Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit	Bore mg. p. 100 cc.	Ammoniac (mg.) produit
0	5,3	0,100	5,0	5	4,5
»	4,8	»	5,1	»	4,6
0,005	5,0	0,500	5,3	10	4,3
»	5,1	»	5,0	»	4,6
0,010	4,5	1	5,0	20	4,5
»	5,0	»	4,6	»	4,5
0,050	5,0	2,5	5,0		
»	5,0	»	4,8		

OBSERVATIONS. — J'ai employé la terre provenant du même lot qui m'avait précédemment servi à faire l'expérience IX, p. 56 avec le microbe de l'urée.

§ IV. — *Conclusions des expériences faites sur l'ammonisation.*

Des expériences que j'ai faites et dans lesquelles j'ai essayé des doses de bore à partir de 0 mgr. 0005 %, on peut conclure, en tenant compte des traces de bore qui préexistent dans le milieu de culture, que cet élément n'a *aucune influence* sur l'ammonisation de la peptone ou de la caséine, entre les limites : 0 mg. 001 et 100 mg %.

Dans la terre, qui contenait 0 mg. 025 % de bore soluble dans l'eau, on a constaté la même indifférence du microbe ammonisant envers le bore.

CHAPITRE III

La Nitrification

§ I. — Généralités.

Les microbes nitrifiants furent isolés entre 1890 et 1892 par WINOGRADSKY [154, 155]. Pour réaliser cet isolement ce savant s'est servi de milieux strictement minéraux, solidifiés à l'aide de silice gélatineuse.

Parmi ces précurseurs, il faut citer HERAEUS (1), qui, dès 1886 fit cette constatation très importante, que les microbes de la nitrification trouvent le carbone et l'ammoniaque nécessaires à leur alimentation, dans le carbonate d'ammonium que l'on met à leur disposition.

WINOGRADSKY a isolé deux espèces de microbes : l'une qui oxyde l'ammoniaque en acide nitreux (le *microbe nitreux*) et l'autre qui oxyde les nitrites en nitrates (le *microbe nitrique*).

On connaît deux variétés de microbes nitreux : *Nitrosococcus* et *Nitrosomonas* ; alors qu'on ne connaît qu'un seul microbe nitrique.

Les fonctions de ces deux espèces de microbes sont tout à fait spécifiques.

Les microbes nitrifiants sont gênés dans leur développement par les substances organiques, envers lesquelles ils sont d'ailleurs assez sensibles. Le microbe nitreux est plus sensible que le microbe nitrique.

Ni l'une, ni l'autre de ces espèces ne pousse sur un milieu

(1) *Centralbl. für Bakt.*, 1888, t. 3, p. 419. Et FR. CZAPEK, *Biochemie der Pflanzur*, 2^e édi., 2^e volume, p. 183.

à la gélatine ; cependant, le microbe nitrique peut être cultivé sur milieu minéral, solidifié avec de la gélose.

La sensibilité des microbes nitrifiants envers les substances organiques, est beaucoup moindre dans le sol qu'en milieu liquide. Dans le sol, les substances humiques non seulement n'entravent pas la nitrification, mais bien au contraire, la favorisent [114, 115]. WINOGRADSKY, au cours de ses recherches devenues classiques, s'est attaché avec un soin méticuleux à éviter tout apport accidentel de carbone dans les cultures de microbes nitrificateurs qu'il étudiait. Le carbone qu'ils avaient à leur disposition, leur était fourni sous la forme de carbonate basique de magnésium.

Mais les recherches encore plus minutieuses de GODLEWSKY (1896), ont montré que les carbonates à eux seuls ne suffisent pas aux microbes ; il leur faut également du gaz carbonique qu'ils empruntent à l'atmosphère. Il faut donc admettre, que la vraie source de carbone pour les microbes nitrificateurs est le gaz carbonique, qui, se fixant d'abord à l'état de bicarbonate dans le milieu de culture, devient attaquable par les microbes. Ceci nous justifie la nécessité de l'addition d'un carbonate dans le milieu de culture.

Les *microbes nitreux* n'exercent leur action oxydante que sur l'azote ammoniacal. Ils n'ont aucun effet, pas plus oxydant qu'ammonisant, sur les protéines, les amines et les amides.

Ces microbes sont très sensibles en culture pure envers des substances organiques, surtout, envers le glucose et la peptone. 0.2 % de ces substances arrêtent complètement l'activité des microbes.

La concentration optima en ammoniac, pour la nitrification, est de 2 à 2,5 gr. par litre. La sensibilité du microbe nitreux envers le nitrite formé est variable. 13 à 15 gr. de nitrate de magnésium par litre, arrêtent la fermentation ; le nitrate de calcium est moins facilement toléré.

La température optima de culture pour ce microbe est 37°. Un chauffage de cinq minutes à 40-42° le tue.

Le *microbe nitrique* est beaucoup moins sensible envers les substances organiques, surtout envers la peptone et l'asparagine. Il peut s'accommoder et se développer dans un milieu minéral auquel on a ajouté 50 % de bouillon. Le microbe pousse, ainsi que je l'ai dit plus haut, sur un milieu solidifié avec de la gélose.

Le glucose empêche son développement à une concentration de 0,2-0,3 %.

L'extrême sensibilité de ce microbe envers l'azote ammoniacal est particulièrement remarquable : 0,005 gr. d'ammoniac par litre, exerce déjà une action empêchante nette et la dose de 0,154 gr. par litre, arrête complètement la fermentation.

Quant à la concentration en nitrite, elle ne doit pas dépasser 20 gr. par litre, de nitrite de soude. BOULANGER et MASSOL ont trouvé que la vitesse de nitrification est maxima pour une concentration de 1 gr. par litre de nitrite de sodium.

L'optimum de température pour le microbe nitrique est de 37°. Ce microbe est plus résistant à la chaleur que le ferment nitreux. Il est détruit par un chauffage de cinq minutes à 50-55°.

Les recherches de BOULANGER et MASSOL [36] ont montré que ces deux espèces de microbes nitrifiants supportent bien les antiseptiques. Ainsi, le microbe nitreux est relativement peu sensible à l'action toxique des borates, fluorures, sels des métaux lourds. Les microbes nitriques oxydent même les nitrites de baryum, de zinc, de plomb, de manganèse, de cuivre à des concentrations de 0,5 à 1 gr. par litre.

Dans le sol, si les conditions leurs sont favorables, leur activité peut être considérable. Ainsi, d'après les appréciations de DEHÉRAIN [55, 56], ces microbes peuvent produire dans une terre qui n'a pas reçu de fumier, 200 kg. d'azote nitrique par hectare, ce qui revient à 1250 kg. de salpêtre de Chili. 90 % du processus se passe entre la surface du sol et une zone située entre 40-50 cm. de profondeur.

L'activité microbienne est maxima dans une région ayant, à partir de la surface, environ 10 cm. de profondeur.

L'optimum d'humidité est de 17,5 % ; approximativement deux tiers de la capacité maxima du sol.

§ II. — Conditions d'expérience.

Je n'ai étudié la nitrification que sommairement.

Les microbes n'ont pas été isolés à l'état de pureté. Je me suis servi de cultures provenant de la terre et préalablement purifiées par de nombreux passages sur les milieux les plus convenables, dont la composition sera donnée plus loin.

Les cultures furent faites sur des *mâchefers*, partiellement baignés par le milieu liquide, selon la technique employée à cet effet par BOULANGER et MASSOL [36]. Dans ces conditions, j'ai obtenu de bons résultats : meilleurs pour le microbe nitrique que pour le microbe nitreux. Ce dernier dégénérerait progressivement, de sorte que, au moment de l'expérience sa vitalité était inférieure à celle du microbe oxydant les nitrites.

Dans le but de gêner le moins possible le développement du microbe nitreux, j'ai employé dans le milieu que je lui destinais, une dose moitié moindre de sulfate d'ammonium (1 gr. par litre, au lieu de 2 gr.).

Voilà le milieu de culture recommandé par OMÉLIANSKY pour ce microbe : Eau distillée 1000 cc., $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 2 gr., NaCl : 2 gr. ; $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$: 1 gr., SO_4Mg cristl. : 0,5 gr. SO_4Fe : 0,4 gr. et du carbonate de magnésium (0,5 gr. pour 50 cc. de milieu).

Pour la culture du microbe nitrique, j'ai employé le milieu de WINOGRADSKY : Eau distillé : 1.000 cc. ; NO_2K : 1 g. ; $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$: 0,5 g. ; SO_4Mg crist. : 0,3 g. ; CO_3Na_2 (calciné) : 1 g. ; NaCl : 0,5 g. ; SO_4Fe : 0,4 g.

La quantité de bore contenu dans ces deux milieux de culture était (pour 100 cc.) de 0 mg. 003 dans le cas du milieu pour le ferment nitreux, et de 0 mg. 001 pour le milieu du ferment nitrique.

Je n'ai fait qu'une seule série d'expériences avec les microbes nitreux. J'ai, pour cela, employé comme vases de culture, des matras de 500 cc., à col court et large. Ils contenaient 120 gr. de mâchefer et 40 cc. de milieu d'OMÉLIANSKY, additionné de 5 cc. d'un lait stérile de carbonate de magnésium, contenant 0,5 g. de cette substance. Le carbonate de magnésium fut ajouté, après la stérilisation du milieu de culture à 110° pendant 15 minutes.

L'ensemencement fut fait avec 1 cc. de liquide, d'une culture

de 14 jours en pleine activité. Après, les matras ont été maintenus à 27° pendant 10 à 16 jours.

Au début, ce temps était suffisant au microbe récemment isolé pour oxyder tout l'ammoniac qui se trouvait dans le milieu ($2^{00}/_{00}$ de sulfate d'ammonium). Mais ainsi que je l'ai dit plus haut, à la suite des passages successifs, le microbe a rapidement dégénéré, de sorte que, au moment de l'expérience il a oxydé seulement 30 à 45 % de la quantité d'ammoniac mise à sa disposition (1 gr. de sulfate d'ammonium dans un litre).

Tous les essais furent faits en double. Je dois cependant avouer, que l'on rencontrait quelquefois des différences appréciables entre les deux matras d'un même essai. Ce fait ne m'a pas surpris. En effet, les morceaux de mâchefer présentant des formes différentes, la surface totale pour un même poids de celui-ci était forcément variable. Les cultures ont été agitées une fois par jour, à fin d'activer le travail des microbes.

Pour le microbe nitrique, j'ai fait deux séries d'expériences: une avec des mâchefers, l'autre avec le milieu liquide seul.

Dans ce dernier cas, j'ai voulu me placer dans des conditions moins favorables de culture, afin de faciliter la comparaison avec les résultats obtenus avec le microbe nitreux, qui, lui, forcément devait travailler dans des conditions défavorables.

Comme vases de cultures, j'ai employé des fioles coniques dans la série d'expériences sur mâchefer. C'étaient des fioles en verre « France » de 500 cc. contenant 150 gr. de mâchefer et 75 cc. de milieu de culture.

Dans la deuxième série d'expériences, je me suis servi des vases plats, d'un litre de capacité, dans lesquels 50 cc. de liquide formaient une couche d'environ 3 mm., quand le vase était couché.

Après stérilisation à 110°, pendant quinze minutes, on commença avec 1 cc. de liquide d'une culture, où tout le nitrite avait été oxydé (culture âgée de 10-12 jours).

La recherche du nitrite a été faite par la réaction de GRIESS (avec α -naphtylamine et acide sulfanilique). Celle du nitrate par la diphénylamine et celle de l'ammoniaque par le réactif NESSLER.

Pour suivre quantitativement les fermentations, j'ai toujours dosé l'acide nitreux : celui qui se formait dans le cas de la fermentation nitreuse, ou celui qui restait dans le cas de la fermentation nitrrique. A cet effet, le liquide de culture versé dans un ballon jaugé, était complété au volume avec des eaux de lavages, agité et filtré ensuite. Le filtrat, après dilution convenable, servait au dosage de l'acide nitreux.

Ce dosage, je l'ai fait titrimétriquement à l'aide d'une solution $n/100$ de MnO^4K . J'ai mesuré d'un à cinq cc. de cette solution, dans une petite fiole conique et complété ensuite à 10 cc. avec de l'eau distillée, après addition de 2,5 cc. d'acide sulfurique concentré.

Dans cette solution acidifiée de permanganate, je versais le liquide à analyser — qui se trouvait dans une burette — jusqu'à la décoloration complète.

Pour éviter les pertes d'acide nitreux, je versais le liquide très lentement et maintenais la température aux environs de 40° (Voir, dans *Lehrb. d. Techn. Mykol.*, de FR. LAFAR, le chapitre sur la Nitrification).

§ III. — Expériences.

I. — EXPÉRIENCE avec le *microbe nitreux* en culture purifiée à 27° , pendant 10 jours (29 mai-8 juin 1922).

Bore mg. %	Ac. nitreux (mg.) formé	Bore mg. %	Ac. nitreux (mg.) formé	Bore mg. %	Ac. nitreux (mg.) formé
0	8,55	0,100	12,20	5	4,70
»	12,70	»	8,70	»	6,25
0,005	8,20	0,500	6,30	10	3,50
»	—	»	5,30	»	5,50
0,010	7,40	1	6,70	20	2,90
»	—	»	9,50	»	5,30
0,050	6,50	2,5	11,90	50	0
»	7,95	»	8,00	100	0

II. — EXPÉRIENCE avec le *microbe nitrrique* en culture purifiée, à 27° pendant 12 jours (25 mai-6 juin 1922).

Bore mg. % cc.	Ac. nitreux (mg.) oxydé	Bore mg. % cc.	Ac. nitreux (mg.) oxydé	Bore mg. % cc.	Ac. nitreux (mg.) oxydé
0	28,0	20	20,2	100	16,3
10	28,0	50	17,4	»	15,3
20	20,9	»	18,6		

La III^e EXPÉRIENCE fut faite avec le microbe nitrique sur milieu liquide, *sans mâchefer*, dans des vases plats (boîtes de Roux) d'un litre de capacité.

On a mis 50 cc. de milieu de culture et on aensemencé avec 1 cc. d'une culture faite sur mâchefer, où tout le nitrite avait été oxydé.

Dans ces conditions d'expérience, moins favorables pour le développement du microbe, j'ai constaté qu'après 16 jours, à 27°, la totalité du nitrite était oxydée en nitrates, jusqu'à l'essai contenant 10 mg. % de bore.

La dose de 20 mg. % et les suivantes ont été nettement toxiques, en empêchant toute nitrification.

§ IV. — *Conclusions des expériences faites sur la nitrification.*

Les conditions où j'ai travaillé avec les deux espèces de microbes (nitreux et nitrique) ne me permettent en aucune façon de dire que le bore exerce une influence stimulante sur le développement de ces microbes.

Au point de vue toxique, le microbe nitrique est plus ou moins résistant, selon les conditions, plus ou moins favorables de culture, dans lesquelles il se trouve. Ainsi, sur le mâchefer, c'est-à-dire en grande surface, et dans de bonnes conditions d'aération, une dose de 1 gr. de bore par litre (5 gr. 6 d'acide borique), le gêne, mais ne l'empêche pas de travailler.

Si les conditions de développement sont moins bonnes (cultures en milieu liquide, sans mâchefer), une dose de 20 mg. % (approx. 1 gr. d'acide borique par litre) est nettement toxique au microbe.

Pour le microbe nitreux, qui ne possédait pas une forte vitalité, la dose de 50 mg. % a été tout à fait toxique, même dans de bonnes conditions de culture.

CHAPITRE IV

La fixation de l'azote atmosphérique.

GÉNÉRALITÉS

A. *Bacillus radicolica*. — B. *Azotobacter chroocoeum*. — C. *Clostridium Pastorianum*.

Les recherches faites dans le dernier quart du XIX^e siècle ont montré que la fixation de l'azote libre de l'atmosphère, est, incontestablement, l'œuvre de certains microbes.

Quant aux moisissures, leur faculté de fixer l'azote est encore discutée. En tout cas, leur apport en azote, en règle générale, doit être considéré comme faible.

Parmi les moisissures à qui on a reconnu la qualité de fixatrices d'azote, notons : *Aspergillus niger* (Berthelot, Puriewitsch), *Alternaria tenuis* et *Gymnoascus* (Berthelot), *Penicillium glaucum* (Puriewitsch), *Mucor stolonifer*, *Endococcus*, *Phoma betae* (Saida). De même, on a trouvé quelques espèces parmi les hyphomycètes (*Microsporium*, *Homodendrom*, *Cladosporium*).

Certains champignons inférieurs (mucédinés, hyphomycètes, ascomycètes) vivent en symbiose à l'extérieur ou à l'intérieur des racines de certaines plantes, surtout des arbres en formant ce qu'on appelle des « mycorhises ». A priori, tenant compte du fait que l'assimilation de l'azote est faible dans le sol des forêts, il serait vraisemblable de leur attribuer la faculté d'assimiler l'azote libre.

Mais, sur ce fait, les expériences n'ayant abouti qu'à des résultats contradictoires, il est, au moins actuellement, impossible de formuler une conclusion définitive ; sauf, peut-être, pour *Phoma betae*, où la quantité d'azote fixée semble être appréciable (W. FISCHER). D'après TERNETZ [148], ce champignon serait, parfois, même plus actif que l'*Azotobacter* ; il pourrait fixer jusqu'à 18 à 22 mg. d'azote par gramme de sucre consommé.

KOSSOWISCH [90], à la suite de ses dernières recherches (1914), conclut, que ni les champignons, ni les saccharomycètes ne fixent l'azote.

Les algues elles-mêmes — bien qu'on l'ait cru un moment — ne fixent pas davantage d'azote. On a constaté que cette fixation était due, en réalité, à la symbiose constante d'une algue et une bactérie, ainsi que BOUILHAC [35] le mit nettement en évidence pour le *Nostoc punctiforme*, par exemple.

En ce qui concerne les plantes supérieures, les dernières recherches faites en 1915 par MOLIARD [110] n'ont pas davantage confirmé qu'elles étaient susceptibles de fixer directement l'azote libre, ainsi que l'avait affirmé antérieurement MAMELI et POLLACI [98].

Les microbes, restent donc les seuls agents capables, sans contredit, d'introduire l'azote élémentaire dans le cycle de la matière vivante. Deux sortes de microbes : aérobies et anaérobies, accomplissent ce rôle important.

Parmi les microbes aérobies les plus actifs, il faut citer : le *Bacillus radicicola* qui vit sur les racines des légumineuses, en symbiose et l'*Azotobacter chroococcum*, qui, lui, vit libre dans le sol.

Dans la catégorie des anaérobies il existe une espèce très active et très répandue, qui est le *Clostridium Pastorianum*. C'est un *microbe butyrique* type ; et beaucoup de microbes, appartenant à ce groupe, ont, comme lui, la propriété de fixer l'azote libre (OMÉLIANSKY, WINOGRADSKY).

L'activité des microbes fixateurs d'azote est très appréciable dans le sol. Ainsi, la quantité d'azote fixée par hectare, peut

atteindre 125 livres d'après les expériences faites à Rothamsted. On estime en général cette quantité comme variant entre 10 à 50 kg. par hectare, pour les microbes libres dans le sol et de 150 à 200 kg. par hectare, par an, pour les microbes des nodosités.

Le plus répandu de tous ces microbes est le *Clostridium Pastorianum*. L'*Azotobacter* se retrouve surtout dans les terrains cultivés ; de même le *Radiciicola*.

A. *Les bactéries des nodosités.* — On sait depuis les recherches de HELLRIEGEL et WILFARTH, terminées en 1886, que les légumineuses puisent l'azote dont elles ont besoin, dans l'atmosphère, grâce aux nodosités qui se trouvent sur leurs racines. Ils ont reconnu de même, qu'à l'intérieur de ces nodosités, il y a des microbes auxquels elles doivent leur formation et qui fixent en réalité l'azote.

En faveur de la fixation de l'azote atmosphérique par les plantes, HELLRIEGEL et WILFARTH n'ont apporté qu'une preuve indirecte, à savoir, que le développement des légumineuses ne dépend pas de la quantité d'azote qui se trouve dans le sol.

On n'avait pas la preuve irréfutable que l'azote fixé provenait de l'azote élémentaire, ou bien, d'une de ses combinaisons gazeuses, qui pourrait se trouver dans l'atmosphère (oxyde d'azote, p. ex.).

La preuve directe de l'assimilation de l'azote élémentaire par les nodosités, a été apportée en 1892 par SCHLOESING fils et LAURENT [138].

Quant aux nodosités des légumineuses, elles avaient été observées bien longtemps avant HELLRIEGEL et WILFARTH.

VORONIN, en 1866, reconnut même, que les nodosités contiennent des bactéries et FRANK (1879), constata qu'elles n'apparaissent pas si les légumineuses poussent dans un sol stérilisé.

Mais, peu de temps avant qu'HELLRIEGEL et WILFARTH aient publié le résultat de leurs recherches, s'était fortement accréditée l'opinion émise par BRUNCHORST et TSCHIRCH, que, ce

que l'on avait regardé comme des bactéries dans les nodosités, n'étaient que des corpuscules produits par la plante même. Aussi, BRUNCHORST les a-t-il appelés *bactéroïdes*.

Dans ces conditions, l'affirmation d'HELLRIEGEL et WILFARTH que les nodosités contiennent des bactéries ne pouvait pas être facilement acceptable.

C'est BEIJERINCK [8], qui, en 1888 réussit le premier à obtenir des cultures de ces microbes sur milieu artificiel, en faisant des ensemencements avec le contenu des nodosités. De ce fait, l'affirmation d'HELLRIEGEL et WILFARTH trouvait un appui expérimental indiscutable.

BEIJERINCK a employé comme milieu de culture une décoction de feuilles de légumineuses, à laquelle on ajoutait : 0,25 % d'asparagine et 0,5 % de saccharose, et 7 % de gélatine. L'acidité convenable du milieu correspondait, pour 100 cc., à 0,6 cc. d'acide normal.

BEIJERINCK nomma le microbe qu'il avait isolé des nodosités : *Bacillus radicolica*. Il a distingué dès le début deux formes : une plus petite, 0,9 μ long sur 0,18 μ large et une autre beaucoup plus grande : 4-5 μ long sur 1 μ large et très avide d'oxygène. Cette dernière forme appartenait, elle, aux microbes en train de devenir des bactéroïdes ; la première forme étant celle du microbe normal.

Ces bactéries très mobiles sont des aérobies strictes. Elles ne produisent pas de spores. Elles se développent entre 10° et 40°, et présentent, comme nous les verrons, plusieurs variétés. Une température comprise entre 60° et 70° suffit pour les tuer.

Bacillus radicolica se colore facilement par les couleurs d'aniline et ne prend pas Gram.

D'après BEIJERINCK, ce microbe ne produit pas d'enzymes attaquant la gélatine, l'amidon, ou la cellulose.

A l'intérieur des nodosités, on trouve, à côté des bactéries, de petits bâtonnets volumineux et de forme irrégulière. Ceux-ci, possèdent assez souvent des formes caractéristiques, rami-

fiées en Y et en T. Ces formations ont été appelées *bactéroïdes*. On les trouve aussi dans les cultures sur milieu artificiel.

La légumineuse ne peut pas utiliser l'azote emmagasiné dans le corps des bactéries, que lorsque celles-ci se sont transformées en bactéroïdes. Les bactéroïdes sont attaquables par les diastases, tandis que le bacille normal, grâce à sa résistance naturelle aux diastases, vit en parasite, en profitant des hydrates de carbone qui sont mis à sa portée dans les tissus de la plante.

Les bactéroïdes ne doivent pas être considérés comme des formes d'involution, car, ils peuvent se reproduire et se transformer de nouveau en bacilles normaux.

Après BEIJERINCK, le *Bacillus radicicola* a été cultivé également par plusieurs autres auteurs : LAURENT, BRÉAL, NOBBE, HILTNER, MAZÉ, etc.

LAURENT [93] a réussi à le cultiver sur un milieu sans azote, ayant la composition suivante : 0,1 % $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$, 0,01 % SO^4Mg et 5 — 10⁰⁰/₀₀ de saccharose, ou maltose, lactose, dextrine, mannite, glycérine.

Mais, les différents modes de cultiver les microbes des nodosités, n'ont cependant pas permis de conclure que ces microbes fixent l'azote, quand ils poussent sur des milieux artificiels.

Les quantités d'azote fixé étaient toujours très petites, tout près de la limite des erreurs d'expérience. On pensait donc, que la symbiose du microbe avec la légumineuse était indispensable pour que la fixation d'azote ait lieu.

MAZÉ [101, 102] a réussi, en 1897, à démontrer que même en culture sur milieu artificiel, les microbes des nodosités peuvent fixer de fortes quantités d'azote.

MAZÉ est parti de cette idée, que, pour que le microbe puisse manifester son activité fixatrice d'azote, il doit trouver dans le milieu qui est mis à sa disposition de l'azote, sous une forme aussi semblable que possible à celle dont il dispose dans les nodosités des légumineuses. Il est également indispensable de lui fournir la matière hydrocarbonée dans une

concentration plus forte que celle qu'employaient ses devanciers.

Ces considérations l'on conduit à préparer le milieu suivant : une *décoction de haricot* (200 gr. dans un litre d'eau) dans laquelle on a dissout 2 % de saccharose, 1 % de NaCl et des traces de bicarbonate de sodium.

Les cultures des microbes des nodosités faites sur 50 cc. de ce milieu solidifié avec de la gélose, ont fixé, après 16 jours, 23 mg. 4 d'azote.

Les recherches ultérieures de MAZÉ ont montré que le *rapport entre la quantité d'azote initial et celle du sucre, influe sur le résultat final*. Le meilleur résultat est obtenu dans le cas du rapport 1/200. Dans pareilles conditions, on a plus que doublé la richesse en azote du milieu de culture.

Le rapport entre l'azote fixé et le sucre consommé a été sensiblement supérieur à 1/100.

Dans les cultures de *Bacillus radicicola* sur le milieu de MAZÉ, il y a production d'une *substance mucilagineuse* qui est d'autant plus abondante que la quantité d'azote fixé est plus importante. Les recherches de MAZÉ ont montré que cette substance mucilagineuse ne doit pas être considérée comme un simple produit de transformation du sucre ajouté au milieu de culture. C'est une substance azotée provenant de la fixation de l'azote libre et servant de trait d'union entre la plante et les microbes qui se trouvent dans les nodosités.

Cette substance qui est un produit de désassimilation des microbes est assimilable par la plante.

Une question intéressante au point de vue théorique aussi bien que pratique, a été de savoir, si les microbes des nodosités qui se trouvent sur les racines des différentes légumineuses, sont spécifiques de chaque espèce. *Existe-il une ou plusieurs espèces de ces microbes ?*

Dès le début de ses recherches, BEIJERINCK avait conclu en s'en tenant aux caractères morphologiques des microbes, qu'il n'y en a qu'une seule espèce, subdivisée en deux groupes renfermant chacun plusieurs variétés.

Un peu plus tard (1890), BELJERINCK crut pouvoir faire une espèce à part du bacille de la saradelle (*Bacillus Ornithropi*).

NOBBE (1) et ses collaborateurs : SCHMID, HILTNER et HOTTER, ont constaté que les différences *morphologiques* des microbes ne sont pas assez marquées pour servir de base à une classification, ainsi que l'avait fait BELJERINCK. Ils se sont attachés aux propriétés *physiologiques* et *biologiques*, car, ils ont observé dans cet ordre d'idées des différences très appréciables. Ainsi, ils ont trouvé que les bactéries sont *adaptées* à chaque *variété de légumineuse* quant à leur inoculabilité et à leur énergie d'assimiler l'azote.

NOBBE et HILTNER ont constaté par exemple, que *Medicago sativa*, quoique inoculé avec des microbes actifs de *Trifolium pratense*, est resté sans nodosités dans un milieu stérile composé de sable et de terre.

Les microbes des nodosités de *Pisum* et *Vicia*, quoique remplaçables entre eux, présentent encore des différences quant à leur pouvoir fixateur d'azote.

A la suite de leurs recherches très étendues, NOBBE et HILTNER ont conclu à l'existence *d'une seule espèce* de bactéries de légumineuses, avec une *multitude de variétés*, qu'on peut considérer comme des formes d'accommodation aux différentes espèces de légumineuses.

O. KIRCHNER, ayant constaté que le soja ne porte de nodosités que si le sol où il pousse a été mélangé avec un peu de terre arable de Japon, a fait de la bactérie de cette légumineuse une deuxième espèce : « *Rhizobactérium Japonicum* ».

Mais, plus tard, on a vu que le soja peut former des nodosités même dans les sols où l'on n'a pas ajouté de la terre de Japon.

A ce sujet, HILTNER et STÖRMER (2) pensent à la suite de leurs recherches, que la bactérie du *lupin* peut être transformée en celle du *soja*.

Mazé distingue deux groupes de bactéries des nodosités :

(1) Landw. Versuchstationen, 1891, t. 39, p. 327 et 1892, t. 41, p. 137.

(2) Arbeiten aus d. Biol. Abt. d. K. Gesundheitsamtes, 1903, t. 3, p. 127.

un groupe des bactéries des *terrains acides*, que l'on trouve chez les *plantes calcifuges* et un autre groupe des bactéries des *terrains basiques*, que l'on trouve chez les *plantes calcicoles*. Les microbes du premier groupe donnent des cultures très pauvres sur des milieux préparés avec du bouillon de haricots ; c'est le cas des microbes de l'ajonc, du genêt ou du lupin. Par contre, les microbes qui proviennent des plantes calcicoles (terrains basiques) y prospèrent d'une façon surprenante.

En tenant compte des exigences des différents microbes pour leurs *milieux de cultures*, HILTNER et STÖRMER ont conclu à la suite de nouvelles recherches faites dans ce sens, à l'existence de deux espèces : *Rhizobium radicicola* et *Rhizobium Beijerinckii*.

Le *Rhizobium radicicola* pousse très difficilement et même pas du tout sur les milieux à gélatine. A cette espèce appartiennent les microbes des nodosités du lupin, seradelle et soja. Ils poussent seulement sur la gélose.

L'espèce *Rhizobium Beijerinckii* comprend toutes les autres variétés des bactéries des nodosités.

A chaque variété correspondent plusieurs formes d'adaptation des microbes, qui sont susceptibles de se transformer l'une dans l'autre.

Beaucoup de savants se sont occupés de cette question des espèces de microbes des nodosités. Certains ont conclu à l'existence de 4, 5 et même de 11 espèces.

Il nous faut citer encore les recherches de B. FRED et A. DAVEUPORT, qui présentent, au point de vue de la différenciation des microbes des nodosités, un intérêt particulier.

FRED et DAVENPORT [66] ont étudié la *résistance de ces microbes à l'acidité du milieu*, mesurée par sa concentration en *ions hydrogène*. Ils ont trouvé comme le plus sensible à l'acidité le microbe de la luzerne. Voilà le résultat obtenu par ces auteurs :

Bact. de la luzerne, trèfle	$P_H = 4,9$
» du pois, de la vesce	» = 4,7
» du trèfle rouge et des haricots	» = 4,2
» du soja	» = 3,3
» du lupin	» = 3,15.

La production des nodosités dans le sol est favorisée par une bonne aération et par une humidité abondante : 30-50 % de la quantité nécessaire pour la saturation du sol (Gain) [69].

De petites quantités de nitrate de sodium sont néfastes aux cultures de *Radicicola*. Le sulfate d'ammonium se comporte de la même manière (MARSCHAL) [100].

D'après WOHLTMANN (1), une forte addition de CaO , K_2O et P_2O_5 au sol, produit chez les légumineuses une augmentation considérable du nombre des nodosités.

Le manganèse (à l'état de sulfate) à faible dose, a une puissante action stimulante sur l'activité des microbes des nodosités, comme l'a constaté OLARU [117] et puis ROCCASSOLANO.

Dans certaines conditions, ces microbes réduisent les nitrates et les nitrites en ammoniac.

Les légumineuses ne sont pas les seules plantes qui portent sur leurs racines des nodosités contenant des microbes. A la suite de travaux de BOTTLOMEY et SPRATT, on sait aujourd'hui que des plantes appartenant à diverses familles botaniques, peuvent porter sur leurs racines des nodosités bactériennes qui leur donnent un moyen de fixer l'azote atmosphérique. Je citerai entre autres : les Eléagnacées, les Myricacées, les Cycadées, les Alnus, etc...

Dans les nodosités des Cycadées on a trouvé le *Bacillus radiciala* et l'*Azotobacter Chroococcum*, accompagnés parfois d'une algue bleue du genre *Anabana*.

B. — *Azotobacter Chroococcum*.

WINOGRADSKY, pour isoler et pour étudier le *Clostridium Pastorianum* s'est servi des milieux préparés avec des subs-

(1) Journ. f. Landw., 1902, t. 50.

tances ne contenant pas d'azote, car, d'après ce savant, le *Clostridium Pastorianum* peut pousser et se développer dans des milieux complètement purifiés de cet élément.

BEIJERINCK [9] pense au contraire que de traces de substances azotées sont indispensables au développement de ce microbe.

En répétant les expériences de WINOGRADSKY, BEIJERINCK a constaté que le *Clostridium Pastorianum* avait besoin, pour se développer, de traces de composés azotés et qu'il ne poussait pas dans des milieux soigneusement purs d'azote.

Tous les microorganismes qui, comme ce dernier, se contentent de quantités minimales de substances azotées pour leur développement, ont été dénommés par BEIJERINCK : *oligonitrophiles*.

Voilà comme il définit cette notion d' « oligonitrophilie » (1) : « Je comprends par oligonitrophiles, ces microbes qui vivent en libre concurrence, dans le monde microbien, peuvent se développer dans un milieu, sans qu'on mette à leur disposition de combinaisons azotées, mais, à condition toutefois, que l'on ne se soit pas donné la peine d'enlever les dernières traces de ces combinaisons existant naturellement ».

On oppose aux microbes de cette catégorie, ceux, qui, par exemple infectent spontanément les substances richement azotées et qui demandent pour se développer de fortes quantités d'azote. BEIJERINCK les a nommées : *polynitrophiles*.

Entre ces deux extrêmes se placent les *mesonitrophiles*.

C'est en étudiant l'oligonitrophilie des microbes et de certaines algues, que BEIJERINCK a été conduit à découvrir un nouveau microbe fixateur d'azote. C'est un aérobie qu'a formé le premier type d'un nouveau genre, dénommé par ce savant : *Azotobacter*.

Dans une série d'expériences faites à l'obscurité, BEIJERINCK [9] s'est servi comme milieu de culture de l'eau de source

(1) Unter « Oligonitrophilen » verstehe ich diejenigen Mikroben, welche bei freier Konkurrenz mit der übrigen Mikrobienwelt sich in Nährmedien entwickeln, ohne absichtlich zugefügte Stickstoffverbindungen, aber auch ohne dass Fürsorge getroffen wird, um die letzten Spuren dieser Verbindungen zu entfernen [9].

additionnée de 0,02 % de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ et de 2 % de mannite (ou de 0,5 % de propionate de potassium ou de sodium) qu'il ensemença avec un peu de terre. Au bout de quelques jours il s'était formé à la surface du milieu ensemencé, une membrane, dans laquelle BEIJERINCK trouva, parmi d'autres microbes de grosses cellules rondes d'*Azotobacter*.

Le microbe a pu être cultivé et isolé par BEIJERINCK, sur ce même milieu, additionné de 2 % de gélose. Celui-ci distingua dès le début de ses études deux espèces : *Azotobacter chroococcum* et *Azotobacter agilis*.

Azotobacter chroococcum pousse en membrane sur le milieu liquide ensemencé avec de la terre. Après un certain temps les cultures forment un pigment brun qui passe plus tard progressivement au noir.

Dans les vieilles membranes, les cellules sont grosses et groupées en sarcines. C'est uniquement dans les jeunes membranes que l'on trouve l'*Azotobacter chroococcum* avec ses formes typiques. Il apparaît alors au microscope comme un coque, ou un diplocoque, de 3 à 5 μ de diamètre, un peu allongé, avec trois à quatre corpuscules réfringents. Le microbe porte à l'un de ses pôles un, ou plusieurs cils, groupés ensemble et à qui il doit sa mobilité.

Sur la gélose mannitée, il forme des colonies blanches, avec une partie sombre au centre. L'*Azotobacter* pousse également sur bouillon gélatinisé et sur décoction de feuilles de légumineuses gélatinisées ; mais, il ne pousse pas sur la pomme de terre.

PRAZMOWSKY (1) a constaté que l'*Azotobacter chroococcum* peut prendre différentes formes : *bacille*, *diplobacille*, *mono*, *diplo* et *streptocoque*.

Ce microbe est souvent entouré d'une matière glaireuse et à l'exception des bactéries proprement dites il possède un noyau.

L'*Azotobacter agilis* a été trouvé dans les eaux du canal de

(1) *Centralt. f. Bakt.*, II^e Partie, 1912, t. 33, p. 292.

Delft. Il peut se développer sur le même milieu que le précèdent, mais il préfère le glucose à la mannite. Il est doué d'une grande motilité, grâce aux nombreux cils qu'il possède.

Parfois, l'*Azotobacter agilis* se présente en colonies d'une belle fluorescence verte, jaunâtre ou rougeâtre.

A côté de cette espèce d'*Azotobacter*, se place l'*Azotobacter vinelandii* découvert par LIPMANN dans les sols d'Amérique.

Dernièrement on a encore trouvé deux nouvelles espèces : *Azotobacter Beijerinckii* et *Azotobacter vitreum*.

De toutes ces espèces, la plus intéressante est encore l'*Azotobacter chroococcum*.

L'*Azotobacter* ne forme pas de spore. Certains savants (LÖHNIS, p. ex.) considèrent les grosses cellules des vieilles cultures, groupées parfois en sarcines, comme des cellules très résistantes, susceptibles d'assurer la conservation de l'espèce.

Les formes que peut présenter ce microbe sont très nombreuses ; LÖHNIS [96, 97] en a compté 21.

D'après BENECKE et KEUTNER (1), l'*Azotobacter* n'appartient pas aux bactéries, mais aux algues. Ce serait une *algue bleue* (cyanophycée), incolore du genre *Aphanocapsa*.

* * *

Tout en reconnaissant au début que les cultures pures d'*Azotobacter* fixent l'azote élémentaire, BEIJERINCK est revenu ensuite sur sa première opinion. A la suite de ses recherches faites avec VAN DELDEN [10], il conclut que l'*Azotobacter* seul ne fixe pas l'azote ; il n'est susceptible de le faire qu'en symbiose avec d'autres bactéries (*Granulobacter*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus radiobacter*).

Les recherches ultérieures de GERLACH et VOGEL [71] et de FREUDENREICH (2) ont montré que l'*Azotobacter* seul, est par lui-même capable de fixer l'azote atmosphérique. Ce fait a été confirmé depuis par BEIJERINCK.

Pour que le microbe puisse assimiler l'azote, il a besoin

(1) *Ber. d. Deutsch. Botan. Ges.*, 1903, t. 21, p. 333.

(2) *Centralbl. f. Bakt.*, 2^e partie, 1903, t. 10, p. 514.

de l'énergie qui lui est fournie par un hydrate de carbone, ou par une substance ternaire. Il utilise ainsi : la mannite, le glucose, le galactose, le maltose, le sucre interverti, l'amidon, les dextrines, les pentosanes, les substances pectiques, les propionates, les butyrates, les citrates, les lactates, les acétates, etc...

PRINGSHEIM a montré que l'*Azotobacter* utilise également comme source d'énergie, des produits résultant de l'attaque de la cellulose par certaines bactéries. On a, depuis, confirmé ce fait à Rothamsted pour les produits de nature mucilagineuse provenant de l'attaque de la cellulose par *Spyrochaeta cytophaga* (1).

MOCKERIDGE signale que les corps qui réussissent le mieux, comme source de carbone pour l'*Azotobacter*, sont : la mannite, l'inuline, la dextrine, les sucres (arabinose, xylose) le glycol éthylénique, l'acide butyrique, l'acide lactique, etc.

L'optimum de température pour l'activité du microbe est de 28° c.

La quantité d'azote fixée par gr. de sucre consommé, varie dans les milieux liquides, aussi bien que dans le sol, entre de très grandes limites. HOFFMANN et HAMMER [78] ont constaté pour le sol, des variations comprises entre 0 mg. 15 et 14 mg. 47 d'azote fixé pour un gramme de mannite.

Nombreuses sont les causes qui déterminent cette variation. Elles ont été particulièrement étudiées pour les milieux artificiels.

D'abord, pour avoir une bonne culture du microbe, une large aération est nécessaire, car, l'*Azotobacter* est un microbe aérobic strict (*macroaerophile*, d'après le terme employé par BEIJERINCK).

Les substances minérales contenues dans le milieu ont, au point de vue de la qualité et de la quantité, une grande importance pour le développement de l'*Azotobacter*. Avec le phos-

(1) H.-B. HUTCHINSON et J. CLAYTON, *J. Agr. Sci.*, t. 9, 1919, p. 143. Cité d'après *Annual Reports on the Progress of Chemistry for, 1919*, vol. 14. Issued by the Chemical Society (Trad. française par A. KLING), p. 207.

phore, le calcium lui est nécessaire en première ligne. KRZEMIENIEWSKY [91] a reconnu comme éléments indispensables : K, Ca, Mg, S et Ph. Un excès de K et de Mg est nuisible, mais les sels de calcium sont toujours favorables quelle que soit leur proportion. Lui sont utiles : le fer, le manganèse, et fort probablement la silice et l'aluminium (KASERER [88]).

Les sels de manganèse ont une action stimulante prononcée ainsi que l'a montré OLARU [120].

D'après FISCHER (1), l'existence de l'*Azotobacter* dans le sol est conditionné par la présence d'une richesse minima de ce dernier en chaux, de 0,1 %.

CHRISTENSEN [51] a constaté le même fait. Et d'après cet auteur, la présence, ou l'absence de l'*Azotobacter*, peut servir de critérium pour savoir si un sol a besoin de calcium ou non [50]. Dans les sols riches en calcium l'*Azotobacter* domine toujours.

Ce microbe n'aime pas les milieux et les sols acides. Le maximum d'acidité qu'il peut supporter est considéré par certains auteurs comme voisin de $P_H = 6$. (GAINNEY [70]).

Pour se rendre compte si une terre a besoin de chaux, CHRISTENSEN procède de la façon suivante : il ajoute au milieu de BEIJERINCK (eau de source + 0,02 % de PO_4K^2H), 5 gr. de la terre à étudier, en place de la chaux. Si dans ces conditions l'*Azotobacter* ne se développe pas, c'est une preuve que la terre manque de chaux.

CHRISTENSEN a employé aussi le milieu de BEIJERINCK sans phosphore. Il remplaça le phosphate entrant dans la formule de celui-là, par de la terre. On avait là, un moyen de reconnaître si la terre examinée contenait suffisamment de phosphore ou non.

LIPMANN a étudié l'influence de l'humidité du sol sur la fixation de l'azote par l'*Azotobacter*. Le maximum d'azote fixé correspond à 20-25 % d'eau (8,05 mg. d'azote fixé pour un gramme de mannite). Il a trouvé 0,88 mg. d'azote fixé pour une teneur de 4 % d'eau et 2,98 mg. pour 36 % d'eau).

(1) *Centralbl. f. Bakt.*, II^e Partie, 1905, t. 14, p. 33.

Parmi les stimulants de l'Azotobacter, l'humus naturel doit être considéré comme le plus énergique. Il manifeste son action soit à l'état d'acide, soit à l'état d'humate.

L'action stimulante de cette substance a été signalée par KRZEMIENIEWSKY [91]. Ainsi, dans une culture en présence d'humus il a constaté une fixation d'azote de 17 mg. pour un gramme de sucre consommé. L'humus préparé à partir du sucre n'a pas les mêmes propriétés activantes.

L'action stimulante de l'humus a fait l'objet de beaucoup de travaux. On s'est demandé à quoi pourrait être attribuée cette propriété de l'humus. D'après SÖHNGEN [145], il la devrait aux colloïdes minéraux (hydrates de fer, d'aluminium, de silice).

RÖSING et RÉMY [132] l'attribuent au fer, car, l'humus lavé à l'acide chlorhydrique (qui lui enlève le fer) ne possède plus cette même action activante.

D'après BOTTOMLEY [33, 34], l'humus devrait ses propriétés stimulantes à certaines substances semblables aux vitamines, qu'il a dénommées *auximones*. Elles se distinguent des vitamines, par une plus grande résistance à la chaleur (130°).

L'*Azotobacter* jeune, fixe l'azote plus énergiquement que l'*Azotobacter* âgé. La capacité de fixation de l'azote pour les cultures pures est moindre que celles des cultures impures. Le maximum d'azote fixé a été constaté par KRZEMIENIEWSKI, en ensemençant le milieu nutritif de BEIJERINCK avec de la terre fraîche. De même, un mélange de quatre espèces d'*Azotobacter* fixe plus d'azote qu'une seule espèce.

FREUDENREICH en associant l'*Azotobacter* avec le *Bacillus radicicola* a obtenu de bons résultats.

Les cultures d'*Azotobacter* et de *Clostridium* ensemble fixent très bien l'azote. L'*Azotobacter* aérobie, tout en créant les conditions d'anaérobiose favorables au développement du *Clostridium*, s'attaque à l'acide butyrique produit par ce dernier et dont l'accumulation serait susceptible de gêner son développement.

En culture pure le microbe dégénère. Pour le régénérer il

faut *changer*, sinon le milieu de culture, tout ou moins la source carbonée. Il est cependant préférable de le repasser sur de la *terre stérilisée*. Mais, malgré tout, on ne peut pas formuler des règles bien établies pour le renforcement des cultures affaiblies d'*Azotobacter*.

L'*Azotobacter* est un microbe très répandu. Il a été trouvé même dans le sable des dunes (BEIJERINCK, A. KOCH). RITTER ne l'a pas trouvé dans les sols tourbeux, où il y avait, par contre, le *Clostridium Pastorianum*.

BENECKE et KEUTNER ont trouvé l'*Azotobacter* de même que le *Clostridium* dans le plankton des mers et des eaux douces.

Ce microbe résiste bien à la dessiccation. Il peut vivre dans le sol jusqu'à 50-80 cm. de profondeur.

Comme source de carbone l'*Azotobacter* utilise dans le sol les produits de décomposition des substances hydrocarbonées.

Dans les terres pauvres en hydrates de carbonés, ce sont les algues qui lui fournissent le carbone nécessaire. La lumière donc, profite par ce fait, indirectement, à l'*Azotobacter*, en aidant au développement des algues.

L'ameublement du sol facilite aussi la fixation de l'azote par ce microbe.

A. KOCH (1) a obtenu de bons résultats *en ajoutant au sol du sucre*. Mais, ce n'est pas sans présenter un certain danger, car, dans certaines circonstances on peut favoriser le *développement des moisissures*.

L'*ensemencement des sols avec des cultures d'Azotobacter* n'a réussi que très rarement. Ce microbe étant suffisamment répandu, il faut, plutôt, songer à lui créer des conditions favorables à son existence et à son développement.

On a obtenu des résultats favorables dans l'ensemencement des sols avec l'*Azotobacter* en Angleterre et en France (FOUASSIER et LHOMME [64]). BEIJERINCK, pas plus que GERLACH et VOGEL, n'ont réussi dans leurs essais.

Le D^r HALL, de Rothamsted, a apprécié la quantité d'azote

(1) *Mitteilung der Deutsch. Landw. Ges.*, 1906, n° 10.

fixé par l'*Azotobacter*, par hectare, en un an, à 75-125 livres. Il étudia, à ce point de vue, des sols abandonnés à la végétation spontanée et qui n'avaient pas été labourés.

Le *Bacillus radicola* fixerait, d'après les expériences américaines, 125 kg. d'azote par hectare et par an. D'après les Allemands 175 à 200 kg. par an et par hectare ; ce qui vaut, à peu près, une tonne de nitrate de soude.

KÜHNE a évalué la quantité d'azote fixé par les microbes qui vivent librement dans le sol à 66 kg. par hectare.

KOCH et SEIDEL admettent que l'*Azotobacter* ne fait pas de réserves de substances azotées et que l'azote assimilé est employé, exclusivement, pour la formation des substances constitutives de la cellule bactérienne. L'assimilation de l'azote cesserait donc, avec la multiplication des cellules.

La cellule d'*Azotobacter* est très riche en matière protéique. Elle en contient 80 % de sa substance sèche, avec une teneur de 10-12 % d'azote.(1) (GERLACH et VOGEL).

D'après STOKLASA, les cultures d'*Azotobacter* renferment 10% de leur poids, d'azote à l'état de *nucléoprotéides* et de *lécithines*.

KAYSER (2) a montré dernièrement (1920) que l'*Azotobacter agilis* fixe le maximum d'azote en solution mannitique lorsqu'on soumet ses cultures à un éclairage par des radiations jaunes et vertes.

C. — *Clostridium Pastorianum*.

BERTHELOT, qui avait démontré que l'enrichissement du sol en azote est un phénomène d'ordre microbiologique, a essayé d'isoler du sol ces microbes fixateurs d'azote. Mais, toutes ses tentatives, qui durèrent de 1885 à 1893, n'ont abouti à aucun résultat. Il a, finalement, porté son attention sur quelques moisissures, pour lesquelles il a mis en évidence un certain pouvoir fixateur d'azote.

(1) *Centralgef. f. Bakt.* 2^e partie, 1902, t. 9, p. 817.

(2) *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1920, t. 171, p. 969.

C'est WINOGRADSKY [156, 157], qui en 1893, est arrivé à isoler un microbe, qui en absence d'oxygène, s'est montré capable de fixer l'azote atmosphérique, dans un milieu dépourvu de cet élément. Il a appelé ce microbe : *Clostridium Pastorianum*.

Pour l'isoler et le cultiver, WINOGRADSKY a employé le milieu suivant : 0,1 % de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$, 0,02 % de SO^4Mg , 0,001-0,002 % de NaCl , de petites quantités de SO^4Fe et de SO^2Mn puis 2 à 4 % de glucose, ainsi que de la craie.

Ce milieu,ensemencé avec un peu de terre, engendra une fermentation butyrique intense. La fermentation terminée, il constata que la culture s'était enrichie considérablement en azote.

Par une série d'ensemencements successifs faits avec des cultures débarrassées des espèces étrangères, en chauffant au préalable 10 minutes à 75° , WINOGRADSKY est parvenu à isoler trois microbes qui se trouvent généralement associés. Deux de ceux-ci se laissèrent cultiver à l'air sur gélose et étaient incapables de fixer l'azote.

Le troisième, un véritable anaérobie, ne se développait qu'en l'absence d'oxygène et, dans une atmosphère d'azote, il avait la faculté de fixer cet élément. C'était le vrai fixateur d'azote, le *Clostridium Pastorianum*.

L'association des deux autres microbes, que WINOGRADSKY a désignés par α et β , lui est nécessaire pour enlever l'oxygène du milieu et créer ainsi, l'état anaérobique indispensable à son existence.

Le microbe α , est gros ; le β , est très mince, de $0,5 \mu$ d'épaisseur, en filaments longs et contournés. Ces deux microbes ne peuvent pas vivre sans composés azotés. Pour faciliter leur développement, il est donc bon d'ajouter, dès le début, aux milieux de culture une trace d'azote combiné.

Ce soin d'enlever l'oxygène du milieu des cultures du *Clostridium*, peut être rempli par d'autres aérobies : l'*Azotobacter Chroococcum*, par exemple.

Le *Clostridium Pastorianum*, quand il est jeune, se présente

sous la forme de bâtonnets larges de 1,2-1,3 μ et longs de 1,5-2,4 μ . Avant de sporuler la cellule bactérienne se gonfle vers le milieu.

Comme les autres bactéries butyriques, le *Clostridium Pastorianum* se colore par l'iode en violet foncé, propriété qui disparaît quand le microbe est en train de sporuler.

Sa spore, de 1,6 μ à 1,3 μ , est colorable au bleu de méthylène. Elle conserve pendant plusieurs années son pouvoir germinatif.

Le *Clostridium Pastorianum* se développe assez mal sur la gélose et pas du tout sur la gélatine. Il pousse bien sur des tranches de carottes, ou sur la pomme de terre.

Pour fixer l'azote, *Clostridium* a besoin d'une source de carbone. A cet effet il utilise : le glucose, le lévulose, le saccharose, l'inuline, le galactose, les dextrines. Il se différencie ainsi d'autres bactéries butyriques qui font fermenter également : l'amidon, le lactose, la mannite, la glycérine, le lactate de calcium, en produisant plutôt de l'alcool éthylique et surtout de l'alcool butylique.

Dans les conditions où a travaillé WINOGRADSKY (cultures de *Clostridium Pastorianum*, en atmosphère d'azote) le microbe avait fixé environ 2 mg d'azote, pour un gramme de glucose consommé. Au bout de 20 jours, le sucre qui avait complètement disparu, s'était transformé pour 44,7 % en acide acétique (3,714 gr.) et en acide butyrique normal (14,164 gr.) A côté de ces corps, on trouvait, en très petites quantités, divers alcools, particulièrement l'alcool isobutylique, et des traces d'acide lactique.

Clostridium Pastorianum a son optimum vers 30°, mais, la quantité d'azote fixé est plus grande à la température ordinaire qu'à cette température optima.

WINOGRADSKY a constaté que si l'on ajoute au milieu de culture 0,6 gr. d'ammoniaque par litre, sous forme d'un sel ammoniacal, ou d'azote nitrique, sous forme d'un nitrate, le *Clostridium* ne fixe plus d'azote.

La quantité d'azote fixé par le *Clostridium* est en moyenne,

d'après WINOGRADSKY, de 1 mg. 3 à 1 mg. 8, par gramme de sucre consommé. Ce rendement varie avec la quantité de sucre existant primitivement dans le milieu. Ainsi, dans une expérience faite dans un courant d'azote, on a eu :

Avec 2 gr. de sucre une fixation de 2,9 mg. d'azote.

» 3 » » » 8,1 » »

» 6 » » » 12,8 » »

WINOGRADSKY et OMÉLIANSKY ont retrouvé le *Clostridium Pastorianum* dans un grand nombre de sols.

Ce microbe est stimulé dans ses cultures par addition de faibles quantités de manganèse. (OLARU.)

* * *

Pour ce qui concerne le côté théorique de la fixation de l'azote libre par les microbes, nous ne connaissons rien. Par quel mécanisme, un élément chimique tel que l'azote, doué d'une si grande inertie, peut-il s'engager dans des combinaisons organiques et cela, dans des conditions compatibles avec la vie ? Sur ce point, nous sommes réduits à formuler des hypothèses plus ou moins séduisantes.

POUR WINOGRADSKY, le *Clostridium Pastorianum* assimilerait l'azote en le transformant, d'abord, en ammoniac, à l'aide de l'hydrogène naissant.

GERLACH et VOGEL croient, que dans la cellule des microbes fixateurs d'azote, cet élément est directement lié aux substances organiques ternaires, avec production directe d'albumine.

BONNEMA admet l'existence d'une phase préliminaire, dans laquelle, de l'azote serait oxydé en N^2O^3 par des oxydes de fer du sol et l'acide azoteux ainsi formé serait, ensuite, assimilé par les microbes.

L'existence souvent constatée des nitrites dans les nodosités des légumineuses, a suggéré à certains auteurs l'hypothèse, que le nitrite d'ammonium pourrait bien jouer un rôle intermédiaire dans la fixation de l'azote atmosphérique.

Dans cet ordre d'idées, LOEW a constaté que l'éponge de platine humide, produit en contact avec de l'air des traces de nitrite d'ammonium.

Etudes expérimentales.

PREMIÈRE SECTION. — BACILLUS RADICICOLA.

§ I. — Conditions d'expérience.

J'ai fait deux séries d'expériences avec le *Bacillus radicola* : l'une avec le microbe isolé des *nodosités des vesces*, l'autre, avec le microbe des *nodosités des pois*.

Je me suis servi comme milieu de culture d'une décoction de haricots, obtenue en faisant bouillir 200 gr. de haricots flageolets avec un litre d'eau de source, jusqu'au moment où l'enveloppe des graines commence à éclater. Le liquide était ensuite filtré et après y avoir dosé l'azote, dilué d'une manière convenable, en tenant compte des indications de MAZÉ. Cet auteur recommande que dans les milieux de culture ainsi préparés, le rapport entre l'azote et le sucre, soit voisin de 1/200.

Après dilution j'ai ajouté au liquide 2 à 3 % de saccharose et des traces de bicarbonate de soude.

Le milieu ainsi préparé contenait 0 mg. 005 % de bore.

Les expériences furent faites dans des fioles coniques en verre « France » de 500 cc., contenant 50 cc. de milieu, ou dans des matras en verre vert, d'un litre de capacité, contenant 40 cc. de milieu de culture. Dans ce dernier cas, étant donné que les matras n'étaient pas rigoureusement identiques, j'ai fait cinq essais témoins sans bore, afin de me rendre compte des différences qui pouvaient provenir de ce fait.

Le milieu a été stérilisé à 110° pendant 20 minutes et commencé avec une suspension bien homogène d'une culture pure de microbes, faite au préalable sur une décoction de haricots gélosée.

Après ensemencement, les vases furent placés dans la chambre thermostat à 27°.

§ II. — Expériences.

I. — EXPÉRIENCE avec le *Bacillus radicolica* du pois, en culture pure sur bouillon de haricots flageolets contenant 13 mg. % d'azote et 2 % de saccharose.

Durée de l'expérience : 31 jours (7 nov.-8 déc. 1921) à 27°. Fioles coniques de 500 cc., en verre « France », contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	1,25	0,050	1,10	2,5	1,70
»	1,35	»	1,25	»	1,45
0,001	1,35	0,100	1,10	5	1,60
»	1,25	»	1,25	»	1,75
0,005	1,25	0,500	1,20	10	1,75
»	1,20	»	—	»	1,75
0,010	1,25	1	1,40		
»	1,40	»	1,45		

OBSERVATIONS. — Une action favorisante sur la fixation de l'azote est nettement constatée à partir de la dose de 2mg. 5 % de bore.

Vers le dixième jour, les cultures contenant 5 et 10 mg. % de bore étaient devenues très visqueuses. Elles l'étaient moins sur le milieu à 2 mg. 5 % de bore. Dans les autres fioles les cultures n'étaient que filantes.

II. — EXPÉRIENCE avec le *Bacillus radicolica* de la vesce, en culture pure, sur bouillon de haricots flageolets, contenant 17,64 % d'azote et 3 % de saccharose.

Durée de l'expérience : 40 jours (19 nov.-29 déc. 1921) à 27°. Matras d'un litre, en verre vert, contenant 40 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par matras	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par matras	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par matras
0	1,50	0,010	1,45	2,5	1,30
»	1,40	0,050	1,40	»	1,35
»	1,30	»	1,35	5	1,20
»	1,50	0,100	1,40	»	1,35
»	1,45	»	1,50	10	1,20
0,001	1,45	0,500	1,35	»	1,20
0,005	1,40	»	1,30		
»	1,30	1	1,35		
0,010	1,30	»	1,50		

OBSERVATIONS. — Les doses de 5 et 10 mg. % de bore sont légèrement toxiques.

§ III. — Conclusions des expériences faites sur le *Bacillus radiculicola*.

Le milieu de culture que j'ai employé contenait naturellement 0 mg. 005 % de bore. On a essayé l'effet des doses de bore depuis 0 mg. 001 jusqu'à 10 mg. %. Dans ces conditions on ne constate aucun effet stimulant sur le *Bacillus radiculicola* de la vesce ; mais, une légère action toxique pour la dose de 10 mg. de bore %.

Le microbe des nodosités du pois est nettement favorisé par les doses fortes de 5 à 10 mg. de bore % (0,3 à 0,6 gr. d'acide borique par litre).

Cet effet favorisant se traduit d'une manière visible, quelques jours après l'ensemencement, par la consistance que prennent les cultures à partir même de la dose de 2 mg. 5 % de bore. Vers le dixième jour, les cultures sur milieu contenant 5 et 10 mg. % de bore deviennent très visqueuses, tandis que dans les autres, moins riches en bore (au-dessous de 2 mg. 5 %), le milieu de culture n'est que filant.

Il serait possible que cet effet favorisant, ou nocif (dans le cas du microbe des vesces), des doses de bore relativement

fortes, fût dû à une modification de la réaction du milieu à la suite de la combinaison de l'acide borique avec le sucre interverti, résultant de l'action des microbes sur le saccharose du milieu. Ou, peut-être, qu'il fût dû au bore même, mais, en réalité à une teneur beaucoup plus faible que celle qui a été ajoutée au milieu de culture. Cette quantité de *bore actif*, serait celle qui par suite de conditions d'équilibre dues aux concentrations de sucre et d'acide borique, échapperait à la combinaison et se retrouverait dans le milieu à l'état d'acide borique.

Cette quantité de bore actif peut exister dès le début dans le milieu de culture — au moment où toute la quantité de sucre interverti ou de glucose est intacte — ou, elle peut apparaître dans la suite, par la disparition du sucre consommé par les microbes.

DEUXIÈME SECTION. — AZOTOBACTER CHROOCOCCUM

§ I. — *Isolement du microbe.*

Plan des expériences et conditions de travail.

Les expériences ont été faites avec des cultures pures et avec des cultures impures d'*Azotobacter Chroococcum*. Le microbe a été isolé de la terre du jardin de l'Institut Pasteur. A cet effet, j'ai d'abordensemencé le milieu de BEIJERINCK (eau de source + 0,02 % de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ + 2 % de mannite) avec un peu de terre et j'ai maintenu le tout à 27°.

Après dix jours, la surface du liquide de culture était couverte de fragments de membranes microbiennes. Avec ces membranes brunes, qui contenaient, parmi d'autres microbes, des quantités de grosses cellules rondes d'*Azotobacter chroococcum*, je fis un ensemencement sur un milieu de la même composition, solidifiée avec 2 % de gélose dans des tubes à essai. Au bout de deux jours, à 27°, on constata la formation de petites colonies blanches, mais, qui ne contenaient pas des cellules rondes d'*Azotobacter* ainsi que l'on s'y attendait. Ces colonies étaient constituées par de très gros bacilles de dimen-

sions inaccoutumées chez les bactéries et fortement granulés, ne ressemblant en rien aux microbes de la culture primitive sur milieu liquide.

Isolée, cette forme poussait relativement bien sur le milieu gélosé. Après 48 heures, elle y formait des colonies, mais je n'ai jamais eu, même après un temps plus grand, de développement abondant. Je suis cependant arrivé à ce résultat en cultivant le microbe sur de l'extrait de terre (1), additionné de 0,05 % de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ de 2 % de mannite et solidifié avec de la gélose (2 %).

Dans ces conditions, après 48 heures de séjour à 27°, la surface du milieu était entièrement couverte d'une culture d'aspect mucilagineux. Mais au troisième repiquage, le microbe avait tellement dégénéré, qu'il s'est à peine développé.

Avec la première culture satisfaisante, obtenue sur milieu gélosé à l'extrait de terre, je fis desensemencements sur un milieu liquide (dont la composition sera donné plus loin) que j'avais additionné de 2 % d'*humate de sodium*, destiné à favoriser les cultures. C'était la première série d'expériences que je faisais, dans le but de déterminer l'effet du bore, à faibles doses, sur le développement du microbe. Mais, le résultat que j'ai obtenu a été très faible : dans toutes les fioles, aussi bien dans celles qui contenaient du bore, que dans celles qui n'en contenaient pas, le microbe ne s'est que très peu développé.

Pendant les deux mois où j'ai fait des tentatives pour arriver à obtenir une culture active de cette forme microbienne en bacilles, ou à la convertir en vraie forme typique, ronde, de l'*Azotobacter chroococcum*, la culture brute, provenant de l'ensemencement primitif avec de la terre et qui datait du commencement de mai 1920, est toujours restée au thermostat, à 27°.

(1) Pour la préparation de l'extrait de terre, j'ai procédé d'après les indications de LÖNNIS. J'ai ajouté à cet effet, à un kilog de bonne terre de jardin un litre d'eau de source et j'ai chauffé ensuite à l'autoclave, pendant une demi heure à 120°. Après refroidissement, j'ai décanté et filtré le liquide (Voir F. LÖNNIS, *Centralbl. f. Bakt.*, t. 19, 2^e partie, 1907, p. 88).

L'extrait de terre ainsi préparé, contenait 0 mg. 25 de bore ($\approx$ 1 mg. 4 d'acide borique) pour 100 cc.

Au bout de ce temps, la membrane microbienne avait fortement bruni et dans le milieu de culture, le sucre, avait certainement depuis longtemps disparu.

Avec cette membrane qui contenait en abondance de grosses cellules d'*Azotobacter chroococcum*, je fis un nouvel ensemencement sur le milieu de BEIJERINCK à la mannite gélosée.

Dans les colonies qui apparurent cette fois à la surface du milieu, j'ai enfin pu trouver les cellules d'*Azotobacter chroococcum*, à protoplasme granulé, présentant la forme caractéristique ronde. Il n'y avait plus trace de gros bacilles granulés, qui apparurent en abondance et si facilement sur le même milieu, lors du premier isolement fait deux mois auparavant.

A la suite de quelques repiquages faits à partir de ces colonies, j'ai obtenu des colonies qui contenaient à côté d'*Azotobacter*, trois autres microbes : deux bacilles et un microbe petit et rond. C'est ce mélange de microbes qui m'a servi à ensemençer la série de fioles qui contenaient du milieu synthétique avec 0,2 % de humate de sodium et dans lequel j'avais primitivement ensemençé la forme bacille signalée plus haut. Celle-ci s'y était très mal développée et dans le témoin sans bore de la série des essais, je n'ai trouvé que 0,5 mg. d'azote fixé au bout de trois semaines par ce microbe qui doit être, sans doute, une forme particulière de l'*Azotobacter*.

Par ce second ensemencement avec le mélange des microbes, j'ai obtenu de belles cultures en membrane, accompagnées au début d'un certain dégagement de gaz. Après onze jours tout le sucre du milieu de culture avait disparu. Les quantités d'azote fixé au cours de cette expérience, se trouvent consignées dans le tableau de l'expérience I.

En poursuivant l'isolement de l'*Azotobacter chroococcum*, j'ai réussi à me débarrasser des bactéries qui souillaient la culture, mais je ne suis pas parvenu à faire disparaître l'autre microbe petit et rond. Alors, j'ai changé de milieu et j'ai employé l'extrait de terre mannité, solidifié par la gélose. Il

se trouva que ce milieu ne répondait pas du tout au but que je me proposais, car, sur ce dernier, le microbe que je voulais éliminer poussait mieux que l'*Azotobacter* et prenait rapidement le dessus. La culture avait un aspect mucilagineux assez fluide, rappelant la vaseline.

Je suis donc revenu au milieu simple de BEIJERINCK, en me bornant à *remplacer la mannite, par le glucose*. Cette fois, il s'est trouvé que le milieu ainsi préparé ne convenait nullement au développement du microbe qui souillait mes cultures, et au troisième repiquage, j'ai eu enfin la satisfaction d'obtenir des colonies d'*Azotobacter chroococcum* tout à fait pures.

Comme le microbe ne poussait pas assez bien sur le milieu de BEIJERINCK mannité, je l'ai cultivé sur l'extrait de tere solidifié à la gélose, en lui ajoutant d'avance 0,05 % de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ et 2 % de mannite.

J'ai employé d'abord 2 % de gélose pour solidifier le milieu, mais, je me suis aperçu ensuite qu'il est plus avantageux d'employer une proportion de 1,8 % de gélose.

Sur ce milieu, à l'extrait de terre mannité, l'*Azotobacter* poussait abondamment et au bout de quatre jours la culture brunissait vers le milieu du tube. Cette coloration devenait très foncée au bout de 6 à 7 jours. La région colorée de la culture ne dépassait guère $1/3$ de la surface libre de la gélose.

En haut, la coloration brune s'atténuait graduellement et à l'extrémité de la surface, la culture n'était pas pigmentée. En bas, la portion de culture colorée était nettement limitée par un arc courbe ayant sa convexité en haut.

Cette constatation nous laisse à penser que le *taux de l'humidité* dans le milieu gélosé allant en décroissant de bas en haut, il existe dans le milieu une zone, particulièrement convenable, où la teneur en eau est favorable à la *formation du pigment*.

Dans mes expériences, je me suis servi pour ensemençer le milieu de culture, d'un mélange à parties approximativement

égales de ces deux catégories de cellules microbiennes : pigmentées et non pigmentées.

Pour *préparer la semence*, j'introduisais dans 50 cc. de milieu sans sucre, avec un fil de platine, quatre anses de microbes non colorés, prélevés en bas du tube, et ensuite, encore quatre anses de microbes pigmentés. Le tout agité dans la fiole, contenant avec 50 cc. de liquide ainsi des morceaux de tube de verre concassés, donnait facilement une suspension assez homogène. J'ai employé pour ensemençer 50 cc. de milieu de culture, 1 cc. de cette suspension.

Pour conserver le microbe, je le repiquais toutes les trois à quatre semaines. Au bout de sept mois le microbe s'était sensiblement affaibli. Je suis parvenu à le renforcer en le cultivant sur un milieu liquide à la dextrine. Il donnait de nouveau, ensuite, sur milieu gélosé habituel, d'abondantes et florissantes cultures.

Dans mes expériences, j'ai toujours employé pour faire des ensemençements, des cultures âgées de quatre à six jours.

Comme milieu de culture, j'ai préféré au milieu de BELJERINCK à l'eau de source, un milieu artificiel d'une composition chimique mieux définie. Dans la composition de ce milieu, je me suis inspiré d'une formule proposée par LÖHUIS, que j'ai modifiée en lui ajoutant du manganèse, de l'aluminium et de la silice.

Pour préparer le milieu de culture, j'ai dissous dans l'eau redistillée : 0,5 g. de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$, 0,1 g. de SO_4Ca , 0,2 g. de NaCl , 0,2 g. de SO_4Mg cristallisé. J'y ai ajouté ensuite, 1 cc. des solutions suivantes (à 1 % en substance anhydre) : FeCl_3 , SO_4Mn , SiO_2 (à l'état de silicate de soude) et 0,5 cc. de sulfate d'aluminium (1 % en Al_2O_3). Enfin, 20 gr. de saccharose (glucose, mannite, dextrine) et 50 mg. de peptone Chapoteaut ; le tout complété à un litre.

Ce milieu a été réparti par portions de 50 cc. dans des fioles coniques de 250 cc., en verre « France », en y ajoutant 0,25 g. de carbonate de calcium précipité. On a stérilisé ensuite, pendant 15 minutes, à 110° .

L'*Azotobacter chroococcum* se développe sur le milieu de culture dont je viens de donner la composition, au moins tout aussi bien que sur le milieu de BEIJERINCK, à l'eau de source et mannite. Pour sa préparation j'ai employé des substances dont la plupart ont été purifiées par moi-même (1). L'eau également était soigneusement redistillée sous pression réduite, dans un appareil en verre.

Les fioles coniques qui contenaient le milieu de culture, avaient la même ouverture et le même diamètre de fond.

Comme source de carbone pour le développement des microbes, j'ai employé alternativement le saccharose, le glucose, la mannite et la dextrine en proportion de 2 %. Le saccharose s'est montré le plus avantageux pour deux raisons : d'abord, parce qu'il se laissait facilement purifier par recristallisation et deuxièmement, parce qu'il ne se combine pas comme le glucose et la mannite avec l'acide borique (au moins dans les conditions où je l'ai employé).

Les plus belles cultures que j'ai obtenues sur le milieu tel que, furent en présence de la dextrine (2 %). Le glucose, le saccharose et la mannite, qui sont comparables entre elles, donnent un développement beaucoup moins bon, mais, qui est tout de même satisfaisant.

Dans les expériences où j'ai employé le glucose, j'ai eu soin de neutraliser avec de la soude l'acidité développée par la combinaison de ce corps avec l'acide borique. J'ai apprécié que cette neutralisation devenait pratiquement nécessaire à partir de 0,5 mg. de bore % ; et je l'ai effectué en ajoutant pour 50 cc. de milieu les quantités de soude suivantes :

Bore % :	0,5	1	2,5	5
Cm ³ de soude :	0,05 n/5	0,1 n/5	0,2 n/5	0,4 n/5
Bore % :	10	20	50	100 mg.
Cm ³ de soude :	0,75 n/5	0,3 n/1	0,5 n/1	1,0 n/1

Ces diverses proportions de soude ont été calculées d'après mes précédents essais qui se trouvent exposés au début de ce travail.

(1) Voir pour la purification du saccharose, p. 40, la note.

J'ai constaté que le carbonate de calcium ajouté au milieu de culture, n'est pas susceptible de neutraliser l'acidité du composé boroglucosique, dans les conditions de dilution où j'employai le sucre et l'acide borique. J'ai cependant constaté, qu'à chaud, a lieu une neutralisation de cette acidité par le carbonate de calcium, mais que, par refroidissement, la réaction primitive se rétablit.

Les cultures furent maintenues à 27° dans une chambre thermostat, pendant un temps variant de 10 à 32 jours.

A la suite de quelques expériences, je me suis aperçu qu'il y a avantage à agiter les cultures, les résultats devenant de ce fait plus réguliers. Si on ne les agite pas, il y a formation d'une membrane, qui, parfois n'est pas continue. C'est pourquoi il nous a semblé préférable de la dilacérer, par l'agitation.

Dans le cas où il n'y a pas formation de membrane, j'ai remarqué pour les doses de bore un peu plus élevées (à partir de 5 mg. %) la tendance des microbes à la floculation. Dans certains cas mêmes, on constate la production d'un mucilage, qui attache les microbes sous forme d'un bourrelet glaireux, sur les parois du vase, au bord du liquide. C'est le cas des cultures sur milieu à glucose, en présence de 20 mg. % de bore et où l'acidité a été neutralisée avec de la soude.

Etant donné le fait connu que l'humus excite d'une manière très appréciable la croissance de l'*Azotobacter chroococcum* (aussi bien d'ailleurs que de certains autres microbes), j'ai songé à l'utiliser dans quelques-unes de mes expériences.

J'ai préféré ce stimulant à tout autre que l'on pourrait recommander, étant donné que c'est une substance qui se trouve dans la terre et y joue un rôle des plus importants (1).

(1) La préparation de l'humus a été faite en suivant, en lignes générales, les indications de LÖNNIS (*Centralbl. f. Bakt.*, 2^e partie, t. 40, 1914, p. 52). J'ai employé pour son extraction du vieux fumier de cheval. Un kilog de ce fumier fut mélangé avec 5 litres d'eau acidulée avec de l'acide chlorhydrique, afin de décomposer les humates

Après 24 heures de contact, j'ai filtré à travers une toile, et la masse solide

Dans mes recherches, j'ai voulu voir si l'humus qui agit comme stimulant vis-à-vis de l'*Azotobacter chroococcum*, ne modifie pas, en même temps, sa sensibilité envers l'acide borique.

La question peut être posée d'une manière plus générale : *les microbes stimulés par l'humus ne réagissent-ils pas différemment, en sa présence, à l'égard des substances qui leur sont normalement nuisibles, favorables ou même indifférentes ?*

Si, à ce point de vue, l'humus possède une influence quelconque, il est évident, qu'il nous faudra faire une distinction dans leur manière de se comporter vis-à-vis des antiseptiques, *entre les terres riches en humus et celles qui ne le sont pas.*

En ajoutant à un sol une substance antiseptique, telle que l'acide borique par exemple, il se peut que l'on ne constate aucune influence sur l'activité de certains microbes, pour une dose quelconque. Mais, la même dose pourrait avoir un effet très marqué, sur les mêmes microbes, dans un autre sol riche en humus.

Ainsi que je l'ai dit au chapitre premier, p. 22, on a essayé en Amérique de déterminer le pouvoir fertilisant du fumier

ainsi séparée, fut mélangée avec 4 litres d'une solution de soude caustique à 4 % et laissée en contact pendant 24 heures, en agitant de temps en temps.

J'ai ensuite filtré de nouveau à travers une toile et, dans le liquide, j'ai précipité l'humus avec de l'acide chlorhydrique. Après décantation, le précipité fut lavé plusieurs fois, par centrifugation, à l'eau distillée.

Cet humus brut, fut à nouveau redissout dans un peu d'ammoniaque, filtré au papier et reprécipité avec de l'acide chlorhydrique ; le liquide une fois décanté, le précipité fut soigneusement lavé, par centrifugation, avec de l'eau redistillée.

Pour le dessécher, j'ai étalé le magma, en couche mince, sur du papier à filtrer et laissé dessécher à l'air, dans une étuve à 34-37°. Après cette première dessiccation, la substance fut pulvérisée dans un mortier et parfaitement desséchée, par un séjour prolongé dans le vide sur l'acide sulfurique.

L'humus, ainsi préparé, contenait pour 100 gr. : 3,22 d'azote (dosé par la méthode de KJELDAHL), 2,6 de cendres, et 0,0002 de bore (métalloïde).

Cette substance a été ajoutée au milieu de culture à l'état soluble d'*humate de sodium*. A cet effet, elle a d'abord été dissoute par trituration dans un mortier, avec un peu de soude (3 cc. de soude normale pour 2 gr. 5 d'humus) et, dilué ensuite, avec de l'eau redistillée.

de cheval traité avec du bore (ajouté sous forme de borax ou de colémanite).

Dans ces conditions, si on observe qu'une dose déterminée de bore exerce sur une récolte quelconque une action nocive, on peut donner de ce fait deux explications : la toxicité du bore s'est manifestée directement sur la plante, ou, sur certains microbes du sol.

COOK et WILSON font cette remarque que l'action toxique du bore envers la même plante, varie avec la nature du sol sur lequel elle se développe. Ils ont parfois constaté des résultats étranges. Ainsi, ils ont pu voir dans une station d'essai, une certaine dose de bore posséder un pouvoir toxique appréciable, tandis que la même dose et parfois même une dose supérieure, n'avait aucun effet sur la même plante cultivée dans une station différente.

Les propriétés chimiques du sol, peuvent pour une grande partie permettre d'expliquer ces anomalies. Tel sol peut faire passer le bore sous forme de produits insolubles plus rapidement qu'un autre et de ce fait atténuer plus rapidement la toxicité d'une trop forte dose de cet élément.

La plus grande richesse d'un sol en une *espèce microbienne* dont la sensibilité envers le bore serait influencée par l'humus, pourrait, à mon avis, expliquer d'une manière satisfaisante de semblables anomalies.

Si nous considérons une terre où cette espèce microbienne serait peu abondante, ou même ferait complètement défaut, nous constaterons que l'effet nuisible du bore, ajouté avec du fumier, sur la végétation, peut être très faible ou même nul, comparativement à un sol traité seulement avec du fumier sans bore. Cependant, dans un autre sol où cette espèce microbienne est abondante, le bore ajouté en présence du fumier, lui nuira tôt ou tard et on constatera, de ce fait, des dommages manifestes sur la végétation, à une dose de bore même inférieure à celle du cas précédent, si l'on fait la comparaison avec un sol traité par du fumier non boriqué.

Je puis dès à présent annoncer, que j'ai fait une série de

constatations, qui rendent vraisemblable cette manière de voir.

J'ai également essayé des cultures pures d'*Azotobacter* sur de la terre stérilisée, mais elles n'ont pas réussi. J'ai employé pour cela la terre qui m'a servi dans les expériences avec le microbe de l'urée et l'ammonisant et dont j'avais fait une bonne provision. Je rappelle que cette terre contenait 7,7 % d'azote total.

J'ai mis 50 gr. de cette terre dans des fioles en verre « France » de 500 cc. de capacité et après stérilisation à 120°, pendant 2 h. 1/2, je l'ai arrosée avec 15 cc. d'une solution de saccharose à 5 %, contenant 0,02 % de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ et 0,5 cc. d'une suspension d'*Azotobacter chroococcum*. Mais le microbe ne s'est pas développé.

Dans un second essai, j'ai ajouté à la terre 10 % de sable de Fontainebleu purifié, 0,1 % de carbonate de calcium, 15 cc. d'une solution de glucose à 5 % (pour 50 gr. de terre) contenant du phosphate et des microbes. Dans ces conditions, je n'ai pas non plus obtenu de culture, même après trois semaines, à 27°.

La cause de cet insuccès tient, fort probablement, à la grande quantité de substance organique azotée, qui, pendant la stérilisation à 120° durant 2 h. 1/2, a produit non seulement une proportion suffisamment forte d'ammoniaque pour gêner l'*Azotobacter* dans son développement, mais encore d'autres substances qui lui sont toxiques.

§ II. — Expériences.

I. — EXPÉRIENCE AVEC l'*Azotobacter chroococcum*, souillé par trois microbes, sur un milieu synthétique, contenant pour 100 cc. : 2 gr. de glucose et 200 mg. d'humus à l'état d'humate de sodium.

Durée de l'expérience : 11 jours (22 juillet-3 août 1921) à 27°. Fioles coniques en verre « France », avec 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote mg. fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote mg. fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote mg. fixé par fiole
0	3,20	0,050	3,35	2,5	3,35
»	2,65	»	3,65	»	3,10
0,001	2,95	0,100	3,20	5	2,50
»	2,80	»	3,20	»	2,25
0,005	3,35	0,500	3,90	10	1,00
»	2,80	»	3,35	»	1,40
0,010	3,20	1	3,35		
»	3,90	»	3,35		

OBSERVATIONS. — Les cultures n'ont pas été agitées. La toxicité du bore commence à se manifester pour une dose de 5 mg. %.

Les premiers jours a eu lieu une fermentation avec dégagement de gaz. Les cultures ont formé des membranes.

II. — EXPÉRIENCE avec l'*Azotobacter chroococcum*, souillé par deux microbes (une bacille et un petit microbe rond) sur le milieu de BEIJERINCK (eau potable, 0,02 % de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ et 2 % de mannite).

On a réparti 50 cc. de ce milieu dans des fioles coniques de 250 cc. en verre « France ». Durée de l'expérience : 15 jours (25-août-9 septembre 1921) à 27°. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote mg. fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote mg. fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote mg. fixé par fiole
0	3,10	0,050	3,65	2,5	3,70
»	3,55	»	3,55	»	3,65
0,001	3,50	0,100	3,55	5	2,65
»	3,55	»	3,40	»	3,20
0,005	3,55	0,500	3,10	10	2,40
»	3,20	»	3,35	»	2,50
0,010	3,20	1	3,65		
»	3,00	»	3,65		

OBSERVATIONS. — Les cultures n'ont pas été agitées. Elles ont formé des membranes, qui ont, le plus fortement bruni dans la fiole à 1 mg. % de bore. La membrane n'a pas bruni sur le milieu à 5 et à 10 mg. % de bore.

La dose de bore de 10 mg. % est toxique; mais elle l'est moins que dans l'expérience précédente.

III. — EXPÉRIENCE SUR milieu de BELJERINCK (eau potable, 0,02 % de $\text{PO}_4\text{K}^2\text{H}$ et 2 % de mannite) ensemencé avec 1 cc. de macération de terre (20 gr. de terre dans 100 cc. d'eau).

Durée de l'expérience : 21 jours (18 août-8 sept. 1921) à 27°. Fioles coniques en verre « France » contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	2,50	0,010	2,45	1	3,85
»	2,65	0,050	2,65	»	3,45
0,001	2,85	»	2,85	2,5	4,20
»	2,45	0,100	3,15	»	3,45
0,005	3,55	»	3,15	5	3,35
»	3,15	0,500	3,45	»	3,30
0,010	3,00	»	2,95	10	2,60
				»	2,65

OBSERVATIONS. — Les cultures ont formé des membranes qui n'ont pas bruni. Celles-ci étaient minces et n'adhéraient que très faiblement aux parois des vases. Au début il y a eu une légère fermentation accompagnée d'un faible dégagement de gaz.

L'examen microscopique montra, à côté de bactéries et de bacilles, de grandes quantités d'*Azotobacter chroococcum* (environ 50 %).

Par acidification avec de l'acide sulfurique, les cultures dégajaient une forte odeur d'acide butyrique.

Comme conclusion : On ne saurait affirmer que la dose de 10 mg. % de bore est toxique. Les doses de 1 et 2 mg. 5 % semblent avoir un certain effet favorisant.

IV. — EXPÉRIENCE AVEC l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure sur milieu synthétique, contenant 2 % de glucose.

Durée de l'expérience : 33 jours (18 oct.-20 nov. 1921) à 27°. Fioles coniques de 250 cc. en verre « France » avec 50 cc. de milieu.

Bore mg. p. 100 cc.	Azote fixé mg. p. 50 cc.	Sucre consom. mg. p. 50 cc.	Azote fixé mg. p. 1 g. de sucre	Bore mg. p. 100 cc.	Azote fixé mg. p. 50 cc.	Sucre consom. mg. p. 50 cc.	Azote fixé mg. p. 1 g. de sucre
0	2,15	480	4,48	0,500	2,20	485	4,58
»	2,20	490	4,50	»	2,20	500	4,40
0,001	2,20	530	4,19	1	2,45	480	5,10
»	2,15	474	4,55	»	2,20	500	4,40
0,005	2,30	503	4,57	2,5	2,00	430	4,65
»	2,10	460	4,56	»	1,95	420	4,64
0,010	2,15	530	4,00	5	1,95	367	5,31
»	2,20	480	4,60	»	2,00	350	5,71
0,050	2,15	474	4,54	10	1,80	290	6,20
»	2,20	488	4,51	»	1,90	440	4,32
0,100	2,15	480	4,48				
»	2,30	514	4,47				

OBSERVATIONS. — Il est à constater un très faible effet toxique à partir de la dose de 2 mg. 5 % de bore.

Les cultures ont été agitées.

V. — EXPÉRIENCE SUR milieu synthétique à 2 % de saccharose, avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 33 jours (21 déc.-23 janv. 1922) à 27°. Flies coniques de 250 cc. en verre « France » contenant 50 cc. de milieu. Bore ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé p. 1 g. de sucre	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé p. 1 g. de sucre
0	1,80	347	5,19	0,100	1,80	340	5,59
»	1,80	371	4,85	»	2,00	382	5,24
»	1,85	368	5,03	0,500	1,80	368	4,89
0,001	1,85	394	4,74	»	2,00	368	5,43
»	1,65	328	5,03	1	1,80	328	5,49
0,005	1,85	383	4,83	»	1,85	359	5,16
»	1,80	366	4,92	2,5	1,75	311	5,62
0,010	2,00	370	5,41	»	1,80	368	4,89
»	1,95	366	5,33	5	1,65	300	5,50
0,050	1,85	368	5,03	»	1,60	300	5,33
»	1,75	340	5,15	10	1,50	288	5,21
				»	1,55	318	4,87

OBSERVATIONS. — Le sucre a été partout complètement hydrolysé.

Pour le dosage du sucre j'ai d'abord transvasé le contenu de la fiole dans un vase jaugé de 50 cc. et j'ai complété au trait, en rinçant la fiole. Une portion du liquide a été ensuite centrifugée. Après centrifugation, j'ai prélevé d'une part 5 cc. qui m'ont servi pour le dosage du sucre et d'autre part 5 autres cc., dans lesquels j'ai déterminé calorimétriquement la concentration en ions hydrogène (P_H), en employant l'alizarine sulfonate de sodium comme indicateur. Comme termes de comparaison j'employais l'échelle au mélane de PO⁴KH² et PO⁴Na³II de SORESEN.

Les résultats de la détermination de P_H ont été les suivants :

Pour les milieux :	P _H .
de 0 à 1 mg. de bore %	de 6,64 à 6,47
à 2 mg. 5	à peu près 6,24
à 10 mg.	légèrement plus fort que 5,9.

Voir plus loin (p. 119) l'observation II faite sur les expériences XII et XIII.

VI. — EXPÉRIENCE SUR milieu synthétique à 2 % de saccharose et 100 mg. % d'humus, avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 32 jours (3 janv.-4 févr. 1922) à 27°. Fioles coniques de 250 cc. en verre « France ». Bore ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé (mg.) 1 g. de sucre p.	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé (mg.) 1 g. de sucre p.
0	8,05	1,000	8,05	0,500	7,70	1,000	7,70
»	7,90	»	7,90	»	7,40	»	7,40
0,001	7,60	»	7,60	1	7,40	»	7,40
»	7,95	»	7,95	»	7,55	»	7,55
0,005	7,60	»	7,60	2,5	7,45	»	7,45
»	7,50	»	7,50	»	7,55	»	7,55
0,010	7,40	»	7,40	5	6,75	»	6,75
»	7,70	»	7,70	»	6,85	»	6,85
0,050	7,55	»	7,55	10	5,50	848	6,50
»	7,60	»	7,60	»	5,70	841	6,77
0,100	7,65	»	7,65				
»	7,55	»	7,55				

OBSERVATIONS. — Dès le deuxième jour, des membranes fines de microbes se sont abondamment formées sur la surface du milieu de culture, dans toutes les fioles, sauf dans celle à 2 mg. 5 % de bore, qui ne présentait qu'un bourrelet au bord du liquide

Dans la fiole à 5 mg. % de bore, il n'y avait que des flocons de microbes, et dans la fiole contenant 10 mg. % de bore il n'y avait rien.

Le quatrième jour le voile s'était formé dans la fiole à 2 mg. 5 % de bore. Dans la fiole à 5 mg. %, il n'y avait que des lambeaux de membrane, qui pendaient sur les parois du vase tout autour du liquide. Dans les fioles contenant du milieu à 10 mg. % de bore il n'y avait encore rien.

Dans les fioles à 1 et 2 1/2 mg. % de bore le voile microbien, plissé, se trouvait à la surface du liquide, alors qu'il était tombé au fond dans les autres fioles.

Le sixième jour, le voile s'était également formé dans les fioles à 5 et à 10 mg. % de bore.

Les fioles ont été agitées à partir du quatrième jour de la formation du voile.

Vers le quinzième jour, la formation de membrane a cessé partout, sauf dans la fiole à 10 mg. % de bore, où il continuait toujours à s'en former des fragments.

Après trois semaines, des lambeaux de membranes se formaient encore dans la fiole à 10 mg. % de bore ; dans aucune autre fiole il n'y en avait plus.

Le 1^{er} février (après 4 semaines), quelques fragments de membranes flottaient encore dans le milieu à 10 mg. % de bore, tandis que dans les autres fioles il n'y avait qu'un dépôt pulvérulent sur le fond.

La matière humique, ajoutée au milieu à l'état soluble d'humate de sodium, n'a pas été précipitée de sa solution.

Les cultures avaient une odeur qui rappelait celle de la souris.

Pour arrêter l'expérience, j'ai fortement acidulé avec de l'acide sulfurique.

VII. — EXPÉRIENCE sur milieu synthétique à 2 % de saccharose et 100 mg. d'humus, avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 10 jours (9 févr.-19 févr. 1922) à 27°. Fioles coniques à 250 cc., en verre « France », contenant 50 cc. de milieu. Bore ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé p. 1 g. de sucre	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé p. 1 g. de sucre
0	6,10	703	8,68	0,500	6,95	831	8,36
»	6,80	794	8,57	»	6,25	727	8,60
0,001	6,65	790	8,42	1	7,10	849	8,36
»	6,35	783	8,11	»	6,45	776	8,31
0,005	6,65	780	8,52	2,5	5,75	728	7,90
»	—	—	—	»	5,45	685	7,96
0,010	6,95	783	8,87	5	2,45	341	7,18
»	6,40	776	8,25	»	3,15	425	7,41
0,050	6,25	756	8,26	10	0,90	163	5,40
»	6,60	826	8,00	»	1,00	181	5,52
0,100	6,50	780	8,59				
»	6,45	745	8,66				

OBSERVATIONS. — Sur le développement des cultures, voir l'observation de l'expérience précédente faite dans les mêmes conditions de milieu et de température.

Les cultures ont été agitées.

VIII. — EXPÉRIENCE SUR milieu synthétique à 2 % de saccharose et 4 mg. % d'humus, avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 10 jours (23 févr.-5 mars 1922) à 27°. Fioles coniques à 250 cc., en verre « France », contenant 50 cc. de milieu. Bore ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucres (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé p. 1 g. de sucre	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Sucres (mg.) consom.	Azote (mg.) fixé p. 1 g. de sucre
0	3,35	789	4,24	0,500	3,20	727	4,40
»	3,35	796	4,21	»	3,35	786	4,26
0,001	3,15	789	4,00	1	3,20	715	4,48
»	3,15	801	3,93	»	3,00	739	4,06
0,005	3,15	810	3,89	2,5	2,65	667	3,97
»	3,30	774	4,26	»	2,65	626	4,23
0,010	3,05	767	3,98	5	1,65	406	4,06
»	3,30	789	4,18	»	1,80	450	4,00
0,050	3,35	786	4,26	10	0,80	145	5,52
»	3,50	789	4,24	»	0,75	152	4,93
0,100	3,20	774	4,13				
»	3,40	804	4,23				

OBSERVATIONS. — Le troisième jour de l'ensemencement, il s'était formé une membrane à la surface du milieu, sauf dans les fioles contenant 5 et 10 mg. de bore %.

Comme les membranes n'étaient pas continues, elles ont été dilacérées en agitant les cultures.

IX. — EXPÉRIENCE SUR milieu synthétique à 2 % de saccharose, avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 10 jours (3 févr.-5 mars 1922) à 27°. Fioles coniques à 250 cc., en verre « France », contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azo'e (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azo'e (mg.) fixé p. 1 g. de sucre	Bore mg. % cc.	Azo'e (mg.) fixé par fiole	Sucre (mg.) consom.	Azo'e (mg.) fixé p. 1 g. de sucre
0	0,80	189	4,23	1	0,75	202	3,71
»	0,75	176	4,38	»	0,75	183	4,10
0,001	0,70	176	3,98	5	0,60	124	4,84
»	0,75	202	3,71	»	0,60	135	4,44
0,010	0,70	157	4,46	10	0,60	103	5,83
»	0,70	162	4,32	»	0,60	124	4,84
0,100	0,70	195	3,59				
»	0,70	183	3,83				

OBSERVATIONS. — Cette série d'essais a étéensemencée en même temps que la précédente.

Sur le milieu synthétique simple, les cultures ne forment pas de voile. Au bout de six jours, on pouvait voir des flocons de microbes nageant dans le liquide et un dépôt très fin, adhérent aux parois du vase, tout autour, au-dessous du bord du liquide. Un pareil dépôt sur les parois du vase ne se forme pas quand le milieu de culture est additionné d'humus, même en petite quantité (4 mg. %).

Dans les fioles contenant le milieu avec 5 et 10 mg. de bore %, la floculation des microbes était plus accusée et le dépôt sur les parois du vase plus apparent.

Au bout de dix jours, tout le saccharose était hydrolysé dans toutes les fioles.

X. — EXPÉRIENCE SUR milieu synthétique à 2 % de *dextrine*, avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 10 jours (26 mars-6 avril 1922) à 27°. Fioles coniques à 250 cc., en verre « France », contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	1,95	0,050	2,10	2,5	1,75
»	1,95	»	»	»	1,75
0,001	2,25	0,100	2,15	5	1,20
»	»	»	2,05	»	1,35
0,005	2,40	0,500	1,90	10	0,60
»	2,30	»	1,95	»	0,55
0,010	1,85	1	2,15		
»	2,10	»	1,90		

OBSERVATIONS. — La *Dextrine* que j'ai employé dans cette

expérience, était une dextrine blanche, du commerce, contenant 0 mg. 075 % de bore et 55 mg. 5 % d'azote. En introduisant 2 gr. % de cette dextrine, j'ai donc apporté dans le milieu : 0 mg. 0015 de bore et 1 mg. d'azote, pour 100 cc. Le milieu de culture à 2 % de dextrine, contenait, par suite, (en tenant compte également de l'azote contenu dans la peptone ajoutée au milieu), 1 mg. 8 d'azote pour 100 cc. Le bore dosé était au-dessous de 0 mg. 002 %.

La dextrine ne contenait que de faibles traces de sucre réducteur.

J'ai constaté, à l'occasion de cette expérience, que la *dextrine* dont je me suis servi, *contenait une partie* (environ 22 %) *qui est, au moins difficilement hydrolysée par l'Azotobacter chroococcum, sinon, même, tout à fait inutilisable*. C'est ainsi, qu'au bout des 10 jours qu'a duré l'expérience, dans toutes les fioles (à part celle à 10 mg. % de bore), il n'y avait pas trace de sucre réducteur. Mais en chauffant à l'autoclave, à 105°, pendant 1 heure et demie, le liquide acidulé avec de l'acide chlorhydrique (10 %), il devenait réducteur et j'ai pu y doser le sucre, qui, calculé en dextrine, représentait les quantités suivantes, pour 50 cc. de milieu : 232 mg. dans le milieu sans bore, 225 mg. dans le milieu à 1 mg % de bore, 270 mg. dans celui à 5 mg % de bore. Le milieu à 10 mg. % de bore, contenait outre les 225 mg. de dextrine non hydrolysée, encore 375 mg. de sucre réducteur.

En mesurant colorimétriquement la *concentration en ions hydrogène*, dans le milieu de culture à la fin de l'expérience, j'ai trouvé les résultats suivants :

Pour un contenu de bore de	P _H .
0 à 1 mg %	6,47
2½ mg %	6,24
5 mg %	un peu plus fort que 5,90
10 mg. %	5,60

Les cultures n'ont pas été agitées. Elles avaient *une odeur très agréable*, rappelant celle de pomme renette ou de melon. Cette odeur était plus faible dans la fiole à 10 mg. % de bore.

La couleur du liquide de culture était grisâtre, d'une nuance plus faible dans la fiole à 10 mg. % de bore. Dans ce dernier milieu, il n'y a pas eu de formation de membrane et on voyait, vers la fin de l'expérience, des flocons relativement gros, nageant sur la surface du milieu.

XI. — EXPÉRIENCE SUR milieu synthétique à 2 % de *dextrine* + 100 mg. d'*humus* avec l'*Azotobacter chroococcum* en culture pure.

Durée de l'expérience : 11 jours (9 avril-20 avril 1922). Fioles coniques de 250 cc. en verre « France » contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	2,65	0,050	2,25	2,5	1,95
»	2,40	»	2,45	»	1,90
0,001	2,30	0,100	2,40	5	1,60
»	»	»	2,25	»	1,40
0,005	2,40	0,500	2,40	10	0,65
»	»	»	2,10	»	0,60
0,010	2,25	1	2,05		
»	2,25	»	2,30		

OBSERVATIONS. — La présence de l'*humus* (100 mg. %) dans le milieu à dextrine, bien qu'elle n'ait que très faiblement influencé la quantité d'azote fixé, a eu, cependant, une influence sur le rendement (rapport de l'azote fixé, à la dextrine consommée). C'est ainsi, que, dans cette expérience qui a été faite dans les mêmes conditions que la précédente, à part l'addition de l'*humus*, il y avait partout, au bout de dix jours, dans toutes les fioles, de fortes quantités de sucre réducteur à côté d'une quantité de dextrine non hydrolysée. Un dosage fait à la fin de l'expérience dans le milieu sans bore, a donné 212 mg. de dextrine non hydrolysée à côté de 380 mg. de sucre directement réducteur. Dans le milieu à 10 mg. % de bore, j'ai dosé 495 mg. de dextrine non hydrolysée et 335 mg.

de sucre réducteur pour 50 cc. de milieu, contenant, primitivement, 1 gr. de dextrine.

Discussion des expériences X et XI. — J'attache à ces deux séries d'expériences, une importance particulière à cause des conclusions qu'elles permettent de tirer.

En effet, entre les essais sans bore des deux séries d'expériences, avec et sans humus, on constate une différence nette — au point de vue fixation d'azote — en faveur de la première. Mais, en tenant compte des erreurs d'expérience qui doivent être évaluées à 0 mg. 25-0 mg. 30 (l'essai à 0 mg. 010 % de bore de l'expérience X et l'essai à 0 mg. 500 % de bore de l'expérience XI) cette différence, tout en existant réellement, doit être fort probablement, au-dessous de celle de 0 mg. 500, directement constatée, entre les moyennes des deux essais sans bore, des deux séries d'expériences.

On peut donc considérer les deux essais sans bore, de ces deux séries d'expériences, comme ayant réalisé — à une très petite différence près — *la même fixation d'azote*. Avec cette différence toutefois, que le rendement était plus grand sur le milieu de l'humus, que, sur celui où cette substance faisait défaut.

Dans le cas du milieu à la dextrine, *la nature colloïdale de la solution* — par opposition au milieu contenant du glucose et du saccharose — a, certainement empêché, que l'effet stimulant de l'humus se manifeste dès le début, sur la quantité d'azote fixé. L'action stimulante de cette substance, n'a dû se manifester qu'à partir du moment, où, sous l'action directe du microbe, il s'est formé dans le milieu, du glucose, par l'hydrolyse de la dextrine. De ce fait, l'état physique du milieu se modifiait progressivement, par suite de la disparition de la dextrine.

Cet état a dû être atteint quelques jours avant l'arrêt de l'expérience, ce qui prouve la présence de fortes quantités de glucose (380 mg.) dans le milieu et la disparition d'une autre fraction de ce corps, en proportion non moins importantes (496

mg.), à un moment, où, toute la dextrine capable d'être hydrolysée l'est déjà.

Ces conditions favorables pour l'action stimulante de l'humus étant réalisées depuis un certain temps, il faut admettre, pour expliquer la fixation d'une même quantité d'azote, au bout du même temps (10 jours) et dans les mêmes conditions d'expériences, sur le milieu sans bore des deux séries d'essais — avec et sans humus — que, *le développement du microbe a eu lieu, au début, plus lentement sur le milieu avec humus que sur le milieu qui n'en contenait pas.*

Le fait susceptible de confirmer ce raisonnement ne manque pas, car, sur les cultures mêmes, *on constatait nettement*, que le développement du microbe se faisait, les premiers jours, plus rapidement sur le milieu sans humus, que sur celui qui en contenait.

Donc, le résultat final de l'expérience avec l'humus, qui se traduit par à peu près une quantité égale d'azote fixé, sur le milieu sans bore, que sur le même essai sans bore de la série sans humus, est *la résultante des deux phases* : une première où le microbe s'est moins bien développé, et une deuxième, où, il s'est mieux développé en présence qu'en l'absence de l'humus.

Si l'on examine, à présent, l'*effet toxique* produit par le bore à des doses de 10 et de 5 mg. %, dans les deux séries d'expériences, on constate qu'il est *identique* pour la dose de bore de 10 mg. % ; et on peut admettre qu'il est également identique, pour les doses de 5 mg. % de bore.

Donc, dans les deux séries d'essais — avec et sans humus — où l'on peut admettre que la même quantité d'azote fut fixée sur le milieu ne contenant pas de bore, l'effet toxique de ce métalloïde était le même pour les mêmes doses, quoique les conditions d'expériences, au point de vue milieu, n'ont pas été identiques.

Il faut donc conclure, à la suite de cet exposé, que, *l'humus n'influe sur la toxicité du bore vis-à-vis de l'Azotobacter chroococcum, qu'en tant qu'excitant de ce microbe.* Si la présence

de l'humus intensifie le développement du microbe, l'effet toxique du bore est également augmenté ; s'il n'y a aucune modification, l'effet toxique du bore ne subit, lui-même, aucun changement.

* * *

En comparant l'expérience IX, page 113 sur milieu synthétique à 2 % de saccharose, celle sur milieu synthétique à la dextrine sans humus (Exp. X, page 113) et celle sur milieu synthétique au saccharose avec 4 mg. % d'humus, page 123 (voir aussi les courbes, page 122), on peut tirer, comme conclusion générale, que, pour une même dose, la toxicité du bore envers l'*Azotobacter chroococcum* est d'autant plus intense, que le milieu de culture est plus favorable à son développement.

XII. — EXPÉRIENCE avec l'*Azotobacter chroococcum*, en culture pure, sur milieu synthétique à 2 % de glucose et 4 mg. % d'humus.

Durée de l'expérience : 21 jours (19 août-9 sept. 1922) à 27°. Fioles coniques, en verre « France », de 250 cc., contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique et l'acidité neutralisée avec de la soude.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	3,15	10	1,60	50	0
»	2,95	»	1,90	»	0
5	2,20	20	1,45	100	0
»	2,25	»	1,45	»	0

XIII. — EXPÉRIENCE avec l'*Azotobacter chroococcum*, en culture pure, sur milieu synthétique à 2 % de saccharose et 4 mg. % d'humus.

Durée de l'expérience : 21 jours (14 nov.-5 déc. 1922) à 27°. Fioles coniques en verre « France », de 250 cc., contenant 50 cc. de milieu. Le bore a été ajouté sous la forme d'une solution contenant à la fois de l'acide borique (9 parties) et du borax (1 partie).

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par flole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par flole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par flole
0	2,80	10	0,75	50	0
»	2,60	»	0,90	»	0
5	1,40	20	0,65	100	0
»	1,45	»	0,70	»	0

OBSERVATION I. — En comparant ces deux expériences XII et XIII, on voit que sur le milieu contenant du glucose, la toxicité du bore est considérablement atténuée.

Le fait particulièrement intéressant, qui ressort de ces expériences, est également le fait constaté, que *sur le milieu à glucose, contenant 20 % de bore, les microbes forment un ensemble glaireux, qui adhère aux parois du vase, tout autour sur le bord du liquide.* En agitant la culture, l'anneau mucilagineux ainsi formé, se détache à l'état d'un ruban.

Après deux jours de séjour, l'anneau s'était reformé et pouvait atteindre une largeur d'environ 4 mm.

Dans l'expérience IX, page 113 j'ai déjà mentionné la constatation, dans le même ordre de faits, que *l'Azotobacter chroococcum a une tendance à s'agglomérer en flocons, dans le milieu contenant 5 et 10 mg. % de bore.*

Le même fait est également à signaler dans ces expériences, pour ces mêmes concentrations.

OBSERVATION II. — *L'Azotobacter chroococcum* est considéré comme un microbe très sensible à l'acidité. D'après GAINÉY, ce microbe ne tolérerait pas dans le sol une acidité supérieure à $\text{PH} = 6$. Dans le même ordre d'idées, FRED et DAVENPORT ont trouvé que *l'Azotobacter* ne se développe pas dans un milieu liquide, ayant une concentration en ions hydrogènes supérieure à $\text{PH} = 6,5$.

Sans doute, au point de vue quantitatif, cette résistance aux ions hydrogène doit varier d'après les conditions de milieu, c'est ce que GAINÉY lui-même avait déjà fait remarquer.

Dans les conditions où j'ai travaillé, une *variation d'acidité*

se produit dans le milieu de culture, du fait de la combinaison du bore, ajouté en quantités variables, avec le glucose ou le sucre interverti formé par le microbe.

A l'occasion de l'expérience V, p. 109 j'ai à la fin, mesuré colorimétriquement, la concentration en ions hydrogènes (P_H) dans diverses fioles. C'est ainsi que je l'ai trouvé égal à 6,64 dans le milieu sans bore et égal à 5,9 dans le milieu contenant 10 mg. % de bore.

Cette acidité accrue, ajoute-t-elle son effet défavorable à l'action toxique du bore ? Et dans quelle proportion se produirait-elle ?

Dans l'expérience V, où j'ai mesuré le P_H, ainsi que j'ai mentionné plus haut, l'augmentation d'acidité pas plus que la présence du bore à la dose de 10 mg. % n'a pas d'influence sensible sur le développement du microbe.

L'expérience XII nous permet, par contre, de nous rendre compte dans quelle mesure interviendrait cette augmentation d'acidité, provoquée par la combinaison du bore avec le glucose ou le sucre interverti.

En effet, dans cette expérience faite sur le milieu au glucose, l'acidité a été *neutralisée dès le début*, par de la soude ajoutée en quantité convenable et du fait de cette neutralisation préalable, le *facteur acidité a ainsi été éliminé*. Dans ces conditions on constate, au bout de trois semaines, pour le milieu contenant 10 mg. % de bore, une diminution de 44,6 % en moyenne, dans le taux de l'azote fixé (1 mg. 75 au lieu de 3 mg. 1 sur le milieu sans bore).

Dans le milieu au saccharose, où l'acidité (provenant de la combinaison : bore, sucre interverti) entre en jeu *un certain temps* après la mise en marche de l'expérience, on constate, pour la même dose de 10 mg. % de bore, une diminution de 61 % dans la quantité de l'azote fixé (0 mg. 85 au lieu de 2 mg. 7 sur le milieu sans bore).

Toutefois, il ne faut pas perdre de vue, que, dans l'expérience faite sur le milieu glucosé (exp. XII) l'*effet toxique* réel

correspondant à la quantité de bore ajouté, a été *considérablement diminué*, par la présence du glucose.

S'il avait été possible, dans cette expérience, de laisser agir sur le microbe toute la quantité de bore à l'état d'acide borique libre, pendant un certain temps, comme cela se produit dans le milieu au saccharose (avant que celui-ci soit interverti par le microbe) la baisse du taux de l'azote fixé aurait, à coup sûr, dépassé 44,6 %. Elle aurait été comprise entre 44,6 et 61 en se rangeant, fort probablement, plus près de cette dernière valeur.

Ainsi donc, dans les conditions où j'ai travaillé sans avoir neutralisé l'acidité produite par la combinaison du bore avec le sucre interverti, cette dernière n'a pu intervenir que pour peu, et, par suite, *les effets toxiques constatés doivent être attribués, presque en totalité, au bore.*

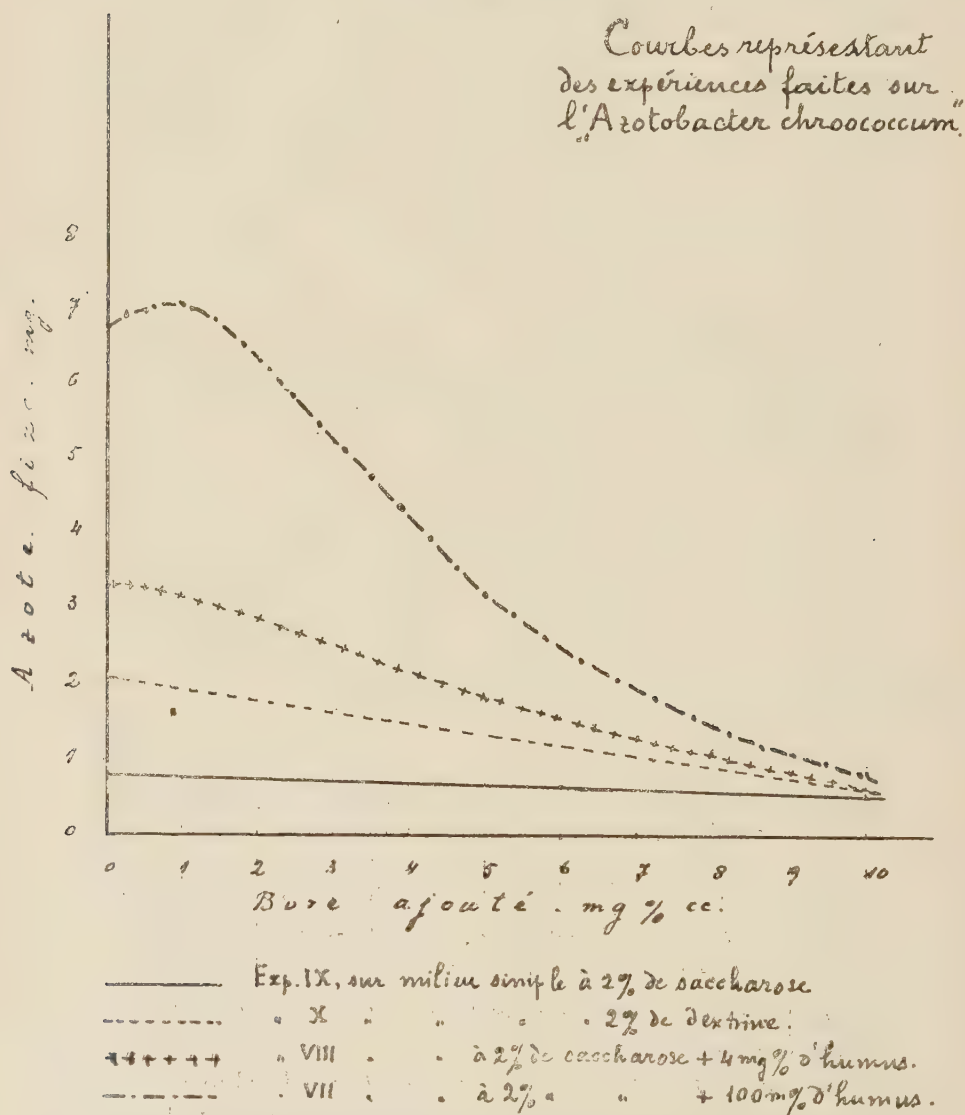
OBSERVATION III. — En comparant les résultats de l'expérience IV, page 109 avec ceux de l'expérience XII, page 118. on constate que *toute intervention d'acidité étant supprimée, il suffit de la présence de 4 mg. d'humus %, dans le milieu de culture pour que l'effet toxique du bore sur l'*Azotobacter chroococcum* soit considérablement augmenté.*

§ III. — *Conclusions et considérations sur les expériences faites avec *Azotobacter chroococcum*.*

Des nombreuses expériences que j'ai faites, il résulte que si le bore n'a aucune action stimulante sur l'*Azotobacter chroococcum*, cultivé en milieu liquide, il manifeste cependant sa toxicité envers ce microbe, avec plus ou moins d'intensité, selon le milieu de culture.

Si le milieu de culture est *peu favorable* au développement du microbe, celui-ci est peu sensible à l'action toxique du bore. Ainsi, sur un milieu synthétique liquide contenant du glucose ou du saccharose, milieu où le développement du microbe est médiocre, une dose de bore de 10 mg. % *ne réduit que relative-*

ment peu la quantité d'azote fixé, comparativement à l'essai sans bore. A cette concentration de 10 mg. % de bore, on a une



fixation de 1,5 mg. d'azote au lieu de 1,8 mg. que l'on constate dans le milieu sans bore (Tableau de l'exp. V et de l'exp. IV).

Si le microbe est stimulé par de l'humus, ajouté au milieu

de culture même en de très petites quantités (4 mg. %), l'effet toxique du bore devient alors très appréciable.

C'est ainsi, que sur milieu synthétique à 2 % de saccharose, en présence de 4 mg. % d'humus (à l'état d'humate de sodium), la dose de 2 mg. 5 % de bore, commence déjà à manifester sa toxicité. Celle de 5 mg. % produit une diminution de 50 % et celle de 10 mg. % une baisse de 76 % (0,8 mg. au lieu de 3,35) dans le taux de l'azote fixé (Tableau de l'exp. VIII).

Si la teneur en humus atteint 100 mg. % cc. de milieu de culture, la toxicité du bore commence à se manifester de même pour la dose de 2 mg. 5 %, mais, dans ce cas, 5 mg. de bore % provoquent une diminution de 60 % (2 mg. 45 au lieu de 6 mg. 1) et 10 mg. %, une baisse de 85 % (0 mg. 9 au lieu de 6 mg. 1) de l'azote fixé, comparativement au témoin sans bore (Tableau de l'expérience VII).

Ces constatations portent sur la quantité d'azote fixé. Si nous nous rapportons au *rendement* (mg. d'azote fixé pour 1 gr. de sucre consommé), nous voyons que celui-ci n'est pas modifié par l'addition d'une dose de bore allant jusqu'à 10 mg. %, lorsque l'on emploie un milieu simple au glucose ou au saccharose, où l'on ajoute une faible quantité d'humus (4 mg. p. ex.). Voir les expériences V et VIII.

Si le milieu contient une dose plus forte d'humus (100 mg. %), l'effet toxique du bore se fait ressentir non seulement sur le taux d'azote fixé, mais aussi, sur le rendement lui-même.

Dans une expérience faite dans ces conditions et qui a duré 10 jours (tableau de l'exp. VII), on voit nettement; comment le rendement commence à baisser à partir de la dose de 2 mg. 5 de bore %, pour arriver, ensuite, à une diminution de 36 % (5,5 au lieu de 8,6) pour la dose de 10 mg. de bore %.

Le tableau de l'expérience VI — où sont consignés les résultats d'une expérience faite également en présence de 100 mg. % d'humus — sauf, que dans ce cas l'expérience s'est prolongée pendant 32 jours — montre des variations dans le même sens.

Sur le milieu simple, sans humus, contenant de la dextrine, l'*Azotobacter chroococcum* se développe beaucoup mieux que sur le milieu contenant du glucose ou du saccharose. Ainsi, tandis que en présence du glucose ou du saccharose l'azote fixé est de 0,8 mg. pour une durée d'expérience de 11 jours (tableau de l'exp. IX), on a pour le même milieu contenant 2 % de dextrine, en opérant dans les mêmes conditions de température et de durée, le triple d'azote fixé (tableau de l'exp. X).

Néanmoins, le développement du microbe tout en étant très satisfaisant sur le milieu à dextrine, reste inférieur à celui que l'on constate sur le milieu, au glucose ou au saccharose, en présence de l'humus, même en proportion de 4 mg. % (tableau de l'exp. VIII).

J'ai également constaté que l'addition de l'humus au milieu de culture contenant de la dextrine, ne produit presque pas d'effet — même à une dose de 100 mg. % — sur le développement du microbe. Ceci est vrai, tout au moins, pour le cas où les cultures ne sont pas agitées (Exp. X et exp. XI).

Quant à l'action toxique du bore, elle est accrue sur le milieu à la dextrine, de même, qu'elle l'est, sur le milieu à l'humus. La toxicité du bore se manifeste déjà sur ce milieu pour une dose de 2 mg. 5, la même, à laquelle l'action toxique de cet élément commence à se faire sentir sur un milieu à l'humus.

En présence de l'humus, qui dans le cas de la dextrine n'a qu'un très faible effet sur le développement de l'*Azotobacter chroococcum*, l'action toxique du bore est la même que sur le milieu à la dextrine simple.

En considérant les effets du bore sur les cultures d'*Azotobacter chroococcum*, dans les conditions précédemment décrites, on pourrait conclure, que dans le cas de ce microbe, plus le milieu est favorable, plus l'effet toxique du bore est grand.

Si les constatations que j'ai faites à ce point de vue, sont également applicables au microbe qui pousse dans le sol, on

serait alors en droit d'affirmer, que plus le sol est riche en humus (ou d'une manière générale favorable au développement de l'*Azotobacter*), plus l'effet toxique du bore est considérable ; toxicité, qui se manifeste par une diminution de la quantité d'azote fixée par ce microbe.

Dans les expériences que j'ai faites sur le microbe de l'urée, j'ai montré que la toxicité du bore est atténuée en présence du glucose (2 % dans le cas étudié).

J'ai eu une nouvelle confirmation de ce fait, en étudiant l'*Azotobacter chroococcum*. Le tableau de l'expérience XIII représente les résultats d'une série d'essais, faits en présence de 4 mg. $\frac{1}{2}$ d'humus sur le milieu liquide au saccharose, et le tableau de l'expérience XII, les résultats d'une autre série d'expériences, faites dans les mêmes conditions, mais sur un milieu contenant du glucose.

On voit, que dans le premier cas, la dose de 5 mg. % de bore réduit la quantité de l'azote fixé de 45 % et dans le second cas, seulement de 29 %. Et, tandis que 20 mg. % de bore diminue le taux de l'azote fixé de 75 % sur le milieu au saccharose, il ne le diminue que de 50 % en présence de glucose.

Dans les deux cas, une concentration de 50 mg. de bore % (2 gr. 8 d'acide borique par litre) est nettement toxique pour l'*Azotobacter chroococcum*.

TROISIÈME SECTION. — CLOSTRIDIUM PASTORIANUM.

§ I. — Conditions d'expériences.

Pour cultiver le *Clostridium Pastorianum*, je me suis servi du milieu de WINOGRADSKY, contenant pour un litre de solution : 30 gr. de glucose, 1 gr. de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$, 0 gr. 2 de SO^4Mg crist., 0 gr. 01 de NaCl , 0 gr. 01 de SO^4Fe crist., 0 gr. 0050 de SO^4Mn crist. J'ai ajouté ensuite 50 mg. de peptone « Chaptault ».

Les expériences furent faites dans des fioles coniques, en verre « France », de 250 cc. Chaque fiole contenait 50 cc. de milieu, avec 2 gr. 5 de CO^3Ca précipité. La stérilisation a été faite à 110° pendant 15 minutes.

Le bore fut ajouté à l'état d'acide borique et l'acidité, provoquée par sa combinaison avec le glucose, *neutralisée* par la soude, ainsi que je l'ai expliqué précédemment pour l'*Azotobacter*. Dans ce cas, j'ai ajouté à 50 cc. de milieu la même quantité de soude que j'ai employée dans le même but, pour 50 cc. de milieu à 2 % de glucose dans le cas de l'*Azotobacter*. Des essais préalables, m'ont montré qu'il n'y a pas de différence à ce point de vue — au moins pour les concentrations d'acide borique que j'ai employées — si la solution boriquée contient 2 ou 3 % de glucose.

J'ai également fait une série d'essais, en présence d'humus, afin de voir si la sensibilité des cultures de *Clostridium Pastorianum* au bore serait, comme celle l'*Azotobacter chroococcum*, augmentée par la présence de cette substance.

J'ai isolé le *Clostridium* de la terre du jardin de l'Institut Pasteur, en suivant les indications de WINOGRADSKY. A cet effet j'ai chauffé à 75°, pendant 10 minutes, la première culture brute obtenue par l'ensemencement du milieu avec de la terre. De cette culture pasteurisée, j'ai fait un second ensemencement sur milieu stérile. Cette deuxième culture fut pasteurisée à 75°, comme la précédente, et servit elle-même à ensemençer une nouvelle portion du même milieu.

A la suite de cinq opérations semblables, j'avais dans la dernière culture de gros bâtonnets, qui, à l'état jeune, se coloraient en violet foncé par l'iode, à côté de *bâtonnets fins*, groupés parfois en *longs filaments contournés* et qui, eux, ne se coloraient pas par l'iode. Ce petit microbe représente le *compagnon aérobic* β du *Clostridium Pastorianum*.

C'est ce mélange de *Clostridium* et de son petit compagnon aérobic, qui m'a servi dans mes expériences.

Elles se sont poursuivies dans de *très bonnes conditions* et surtout dans le milieu à l'*humus*, où la fermentation a été particulièrement intense.

L'ensemencement des fioles a été fait avec un demi cm³ de liquide, provenant d'une culture en milieu liquide sans

humus et où la première phase de fermentation intense était terminée (environ 15 jours).

Les fioles ensemencées furent maintenues à 27° dans la chambre thermostat et secouées de temps en temps après le commencement de la fermentation.

Le milieu de cultures contenait 0 mg. 0015 % de bore.

Les expériences ont été interrompues, en général, au moment de la disparition du sucre dans les fioles sans bore, ou quelques jours plus tard.

J'ai cherché le glucose dans les cultures à l'aide de bleu de méthylène, ainsi que l'a fait BEIJERINCK [10] pour se renseigner sur la présence de ce sucre dans les cultures. A cet effet, je versais dans un tube à essai quelques centimètres cubes d'une solution faible de bleu de méthylène, en lui ajoutant quelques gouttes d'une solution de potasse caustique et je portais ensuite à l'ébullition. En retirant du feu, je laissais tomber dans la solution chaude de bleu de méthylène alcalinisée, une goutte ou deux du liquide de culture à examiner, prélevé aseptiquement. En présence de glucose, même en de minimes quantités, le liquide se décolore immédiatement.

Pour arrêter les expériences, j'ai fortement acidulé les cultures avec de l'acide sulfurique.

§ II. — Expériences.

I. — EXPÉRIENCE avec le *Clostridium Pastorianum* et son petit compagnon aérobic (β) en cultures pures, sur milieu sans humus, à 3 % de glucose.

Fioles coniques en verre « France », contenant 250 cc. de milieu. Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique. Durée de l'expérience : 30 jours (3 juillet- 2 août 1922) à 27°.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	2,90	0,100	2,95	5	3,50
»	3,10	»	3,15	10	2,90
»	3,30	0,500	3,15	10	3,10
0,005	3,10	»	3,40	20	3,20
»	3,10	1	3,10	20	3,15
0,010	2,95	»	3,20	50	1,75
»	3,10	2,5	3,15	50	2,45
0,050	3,10	»	3,30	100	1,55
»	3,10	5	3,40	»	1,40

OBSERVATIONS sur la marche de l'expérience — Après 48 heures, la fermentation avait commencé dans toutes les fioles jusqu'à celle contenant le milieu à 10 mg. % de bore. Dans celle-ci elle était faible. La fermentation semblait être plus intense dans les fioles à 0 mg. 1 et à 0 mg. 5 % de bore.

Le troisième jour, l'essai à 20 mg. % commence également à fermenter.

L'essai à 50 mg. % de bore n'entra en fermentation que le onzième jour et celui à 100 mg. % le dix-huitième jour.

Au bout de 30 jours, quand l'expérience fut arrêté, il y avait du sucre en quantité appréciable dans le milieu à 50 mg. % de bore et en très forte quantité dans celui à 100 mg. %. Partout ailleurs il n'y en avait plus de traces.

Comme conclusion : le bore à partir d'une dose de 50 mg. % est toxique pour les cultures.

II. — EXPÉRIENCE avec le *Clostridium Pastorianum* et son petit compagnon aérobie (β) en cultures pures, sur le milieu avec 100 mg. % d'humus et 3 % de glucose.

Durée de l'expérience 14 jours (11 août-25 août 1922) à 27°. Fioles coniques de 250 cc. en verre « France ». Le bore a été ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	4,00	0,100	4,15	20	4,00
»	3,80	0,500	4,00	»	4,15
0,005	4,10	»	»	50	3,70
»	4,20	1	4,10	»	3,70
0,010	4,30	»	4,15		
»	4,10	5,0	3,80		
0,050	3,90	»	4,20	100	2,90
»	4,20	10	4,00	»	3,15
0,100	4,00	»	4,00		

III. — EXPÉRIENCE avec le *Clostridium Pastorianum* et son petit compagnon aérobie (β) en cultures pures, sur le milieu à 3 % de glucose, sans humus.

Durée de l'expérience : 24 jours (11 août-4 septembre 1922) à 27°. Fioles coniques de 250 cc., en verre « France », contenant 50 cc. de milieu. Le bore ajouté à l'état d'acide borique.

Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole	Bore mg. % cc.	Azote (mg.) fixé par fiole
0	2,95	10	3,30	100	2,40
»	2,95	20	3,20	»	2,30
1	3,20	»	3,15		
»	3,20	50	2,45		
10	3,20	»	2,50		

OBSERVATIONS sur la marche de la II^e et III^e série d'expérience. — Les deux séries d'expériences ont été ensemencées à la fois, le 11 août à 2 h. de l'après-midi.

Le lendemain, jusqu'au soir, la fermentation n'avait nulle part commencé.

Le 13 août, à 9 heures de matin, la série contenant de l'humus était en pleine fermentation jusqu'aux fioles contenant 10 mg. de bore %, où, la fermentation ne faisait que commencer. Elle était très intense dans les autres fioles, où toute la surface du milieu était couverte d'une couche d'écume, épaisse d'environ 4 mm, formée de petites boules de gaz, étroitement serrées les unes aux autres.

Dans la série sans humus la fermentation avait commencé dans toutes les fioles, jusqu'à la dose de 5 mg. de bore % comprise. Elle était de beaucoup moins intense que dans la série avec humus. Les bulles de gaz qui couvraient la surface du milieu étaient grosses et espacées entre elles.

Le même jour (13 août), à 5 h. du soir, l'essai sur milieu à humus, contenant 20 mg. % de bore, était en fermentation très avancée et l'essai de la série sans humus, contenant 10 mg. % avait lui aussi commencé à fermenter ; mais, il ne le faisait que très faiblement.

Le 14 août (le troisième jour) à midi. Très intense fermentation dans la série avec humus jusqu'à la dose de 20 mg. % de bore comprise. Les milieux 50 et 100 mg. % de bore ne fermentent pas.

Dans la série sans humus, la fermentation est intense dans toutes les fioles contenant jusqu'à 1 mg. de bore %. La surface des milieux est couverte de grosses bulles. Dans le milieu contenant 5 mg. de bore % la fermentation est moins forte et sur le milieu à 10 mg. % de bore elle est très faible. Sur le milieu à 20 mg. % de bore elle commence à peine. Rien dans les fioles à 50 et à 100 mg. % de bore.

Le 16 août (le cinquième jour). La fermentation commence dans la série avec humus dans le milieu contenant 50 mg. % de bore (quelques petites bulles de gaz par ci par là.)

Le 17 août (le sixième jour). L'essai à 50 mg. % de bore de la série avec humus se trouve en pleine fermentation.

Rien dans les fioles à 50 et à 100 mg. de bore % de la série sans humus. Les milieux à 10 et 20 mg. % de bore, de cette série fermentent, mais plus faiblement que les autres de la même série.

Le 21 août (le dixième jour) il y avait encore de petites quantités de sucre dans l'essai sans bore de la série avec humus.

Au bout de deux semaines (le 25 août), le sucre avait complètement disparu partout dans la série avec humus, à part l'essai à 50 mg. % de bore, où il y en avait encore des traces. A ce moment l'expérience fut arrêtée, mais je laissai toutefois au thermostat l'essai à 100 mg. % de bore, de même que toute la série d'essais sans humus.

Le 26 août (le 15^e jour) le milieu à 100 mg. % de bore de la série sans humus commence très faiblement à fermenter.

Le 27 août (le 16^e jour) c'est l'essai à 100 mg. % de bore de la série avec humus qui se met à fermenter, lui aussi très faiblement.

J'ai dosé le sucre resté non consommé dans le milieu à 100 mg. % de bore, avec et sans humus, au moment où j'y ai arrêté la fermentation (le 4 septembre).

Dans les 50 cc. de milieu avec humus, le microbe avait consommé 1027 mg. de glucose pour fixer 3 mg. 15 d'azote ; et dans le milieu sans humus, il avait disparu 808 mg. de sucre, pour une fixation de 2 mg. 2 d'azote.

En rapportant à 1500 mg. de sucre — quantité contenue dans 50 cc. de milieu de chaque fiole — on a 4 mg. 6 d'azote fixé en présence de l'humus et 4 mg. 2 sur le milieu simple.

§ III. — *Conclusions des expériences faites sur le Clostridium Pastorianum.*

Des expériences faites avec le *Clostridium Pastorianum* associé à son petit microbe aérobic β , il faut conclure que l'action du bore se manifeste surtout sur ce petit compagnon. Cette affirmation est basée sur la constatation faite, que la dose la plus forte de bore que j'ai employée dans mes expériences (celle de 100 mg. % soit 5 gr. 6 d'acide borique par litre) retarde la fermentation de plus de deux semaines, mais, ne l'empêche pas. Une fois déclanchée, elle continue avec une activité croissante.

L'humus ajouté à une dose de 100 mg. % au milieu de culture, à l'état d'humate de sodium, accélère la fermentation de telle sorte, que le sucre disparaît du milieu en moitié moins de temps (15 jours environs) que dans le milieu simple.

L'addition de cette substance produit à la fois une augmentation du rendement, variant de 30 à 35 % (en moyenne 4 mg. d'azote fixé pour 1 gr. 5 de sucre consommé, au lieu de 3 mg. que l'on constate dans le milieu sans humus).

L'addition de l'humus à la dose de 100 mg. %, amène aussi une légère modification dans la sensibilité du *Clostridium* associé à la petite espèce de microbe β , envers l'action toxique du bore de telle sorte, que les microbes en sont *moins gênés*. C'est ainsi que l'on constate pour la dose de 50 mg. % de bore une diminution de 20 % dans la quantité de l'azote fixé en absence de l'humus, et de 10 % seulement, pour une même dose de bore, en présence de l'humus.

Dans le cas du *Clostridium Pastorianum*, l'humus ajouté au milieu de culture sous forme soluble d'humate de sodium, ne s'y maintient pas pendant toute la durée des cultures. Au bout de trois ou quatre jours, après le commencement de la fermenta-

tation, il est précipité à l'état d'humate de calcium, par une double décomposition entre l'humate de sodium et le butyrate de calcium. Ce dernier, apparaît dans le milieu de culture, à la suite de la saturation de l'acide butyrique, produit au cours de la fermentation, par le carbonate de calcium ajouté en excès.

CHAPITRE V

Conclusions et Considérations générales.

Les conclusions les plus importantes qui se dégagent de mes recherches relatives à l'action du bore sur la *fermentation de l'urée*, sur l'*ammonisation*, sur la *nitrification* et sur la *fixation de l'azote libre* par le *Bacillus radicola*, l'*Azotobacter chroococcum* et le *Clostridium Pastorianum*, sont les suivantes :

A. — Action favorisante :

1) Le bore a une très faible action stimulante sur le ferment de l'urée, pour des doses comprises entre 0 mg. 004 et 0 mg. 010 % (exprimés en métalloïde), sur milieu liquide.

2) *Bacillus radicola* du pois est nettement favorisé par des doses relativement fortes d'acide borique, correspondant à une teneur de 5 à 10 mg de bore % (c. à d. approx. 0,3 à 0,6 gr. d'acide borique par litre.)

B. — Action toxique.

1) L'acide borique est légèrement toxique vis-à-vis du *Bacillus radicola* des vesces. Celui-ci est un peu gêné par une dose d'acide borique correspondant à 10 mg. % de bore (approx. 0,6 gr. d'acide borique par litre).

2) Le microbe de l'urée, est, parmi les microbes étudiés, le plus sensible à l'action toxique du bore. Il est nettement gêné par un dose de 0 mg. 5 % de bore quand il est récemment isolé

de la terre et par une dose de 0 mg. 1 % (1/1.000.000), quand il a été pendant quelque temps cultivé sur milieu artificiel.

Le microbe de l'urée est complètement arrêté dans son développement par une dose de 20 mg. % de bore (c. à d. approx. 1 gramm d'acide borique par litre.)

3) Le bore n'a aucune influence, à faible ou à forte concentration (100 mg. %) (1), sur l'ammonisation de la peptone et de la caséïne.

4) Sur le microbe nitrique, placé dans de bonnes conditions de développements, la dose de 100 mg. % de bore, n'a pas d'influence empêchante ; mais le microbe est assez gêné par cette dose. Dans des conditions moins favorables, une teneur de 20 mg. % de bore (1) arrête complètement le microbe nitrique.

Le microbe nitreux semble se comporter de la même façon.

5) Les faibles doses de bore (essayées à partir de 0 mg. 001 %) n'ont aucune influence sur la fixation de l'azote par l'*Azotobacter Chroococcum*.

Les doses plus élevées sont toxiques.

Les cultures de ce microbe, en milieu liquide, en présence de l'humus, sont très sensibles à l'action toxique du bore.

De même, sur milieu à dextrine, où le microbe se développe beaucoup mieux que sur le milieu au glucose ou au saccharose, l'action toxique du bore est très marquée.

Il résulte, au moins pour les substances que j'ai employées comme sources de carbone, que l'*Azotobacter Chroococcum* est d'autant plus sensible à l'action toxique du bore qu'il se trouve dans un milieu plus favorable à son développement.

La dose de 50 mg. % de bore empêche, dans tous les cas, le développement du microbe.

6) L'action toxique du bore ne semble pas s'exercer sur le *Clostridium Pastorianum*, mais sur le petit microbe aérobie (β) qui l'accompagne.

(1) 100 mg. de bore = 563 mg. d'acide borique.

50 mg. de bore = 281,5 mg. d'acide borique.

20 mg. de bore = 112,6 mg. d'acide borique.

L'humus (100 mg. %) qui stimule la fixation de l'azote par ce microbe, semble amener aussi une légère modification (tout au moins quand le *Clostridium* se trouve associé à la petite espèce aérobie (β)), sur l'action nocive du bore, de sorte que le phénomène s'en trouve moins entravé.

7) Le bore (à l'état d'acide borique ou de borate) est moins toxique en présence du glucose.

* * *

La plus faible dose de bore que j'ai employée dans mes recherches, a été de 0 mg. 0005 % (cinq milliardièmes) pour le ferment de l'urée et pour l'ammonisant, dans des milieux, qui, eux-mêmes, contenaient d'avance 0 mg. 001 % de bore.

Dans le cas de l'*Azotobacter chroococcum* et du *Clostridium Pastorianum*, je suis parti d'une teneur en bore de 0 mg. 001% et pour les microbes nitrifiants de 0 mg. 005 %.

Pour le *Bacillus radicolica* je suis descendu jusqu'à 0 mg. 001 % de bore. Le milieu pour la culture de ce microbe, étant préparé avec une décoction de haricots flageolets, contenait, normalement, 0 mg. 005 de bore.

Dans ces conditions, à part les faibles stimulations par les très petites doses mentionnées dans le cas du ferment de l'urée et celle plus appréciable, par des doses plus élevées, dans le cas du *Bacillus radicolica* du pois, aucune autre influence favorable du bore n'a été constatée.

Les microbes, si le bore leur est utile, doivent en demander, en général, des quantités infimes, car, les recherches de JAY et celles de M. GABR. BERTRAND et H. AGULHON ont montré, que cet élément ne se trouve chez les végétaux, et les deux derniers, chez les animaux, qu'en de très petites quantités.

Il est donc à supposer que les microbes étudiés dans mes recherches, sauf celui de l'urée (1), ont largement trouvé le bore dont ils ont eu besoin, dans les faibles traces de ce métal-loïde, contenu à l'état d'impuretés dans le milieu de culture.

(1) Quant au *Bacillus radicolica* du pois, voir les conclusions sur les expériences faites avec ce microbe, page 96.

Pour préciser ce que je viens de dire, je dois mentionner la question du rôle du manganèse dans le développement de l'*Aspergillus niger*.

Le manganèse fut considéré par RAULIN, à la suite de ses recherches faites avec des substances pratiquement pures, comme inutile pour le développement de l'*Aspergillus niger*. Plus tard, M. GABR. BERTRAND et M. JAVILLIER en reprenant l'étude de ce problème de l'utilité du manganèse, employèrent des *substances minutieusement purifiées* et arrivèrent à démontrer nettement, l'effet favorable de très faibles doses de cet élément sur le développement de l'*Aspergillus niger*.

Dans les expériences de RAULIN, le manganèse qui se trouvait à l'état d'impureté dans le milieu de culture, quoique en très petite quantité, avait, cependant, largement suffi au besoin de la moisissure.

Plus tard, M. GABR. BERTRAND en employant pour les cultures de l'*Aspergillus niger* des substances d'une parfaite pureté, et des vases en quartz en la place des vases en verre, qui pouvaient toujours céder de faibles traces de manganèse au milieu de culture, démontra, que le manganèse est non seulement utile, mais, même indispensable au développement de l'*Aspergillus niger*.

Il trouva que la dose infime de 1/10.000.000.000 de manganèse, ajoutée au milieu de culture complètement dépourvu de cet élément, suffisait pour faire pousser la moisissure qui refusait de se développer en son absence.

Dans le cas des expériences avec les microbes, aux difficultés d'une parfaite purification des substances, vient s'ajouter celle, de composer, avec des substances susceptibles d'être purifiées, un milieu de culture convenable au développement du micro-organisme à étudier. De plus, dans le cas particulier de l'étude de l'influence du bore sur les microbes, il faut se préoccuper aussi, d'exclure de la composition du milieu de culture les substances, qui, en se combinant avec l'acide borique, masqueraient le bore.

Une étude faite dans de pareilles conditions aurait dépassé

les limites les plus reculées de ce travail, qui, a eu pour but, en premier lieu, des recherches d'ordre général ; ainsi, je n'ai pas cru devoir m'y engager.

* * *

En tenant compte de ce qui peut ^{se} passer *dans le sol*, il ne serait pas exagéré de transporter les résultats obtenus en milieu liquide, en s'arrêtant toutefois à la dose de 10 mg. % de bore.

En effet, par suite de l'adsorption qui intervient, surtout dans les terres riches en humus, il est possible que l'on rencontre des concentrations de cet ordre autour des particules colloïdales, où, les microbes sont eux-mêmes rassemblés en plus grand nombre.

On peut, à ce point de vue, conclure, dans la mesure où les expériences en milieu liquide le permettent, que, dans le sol, l'*ammonisation*, la *nitrification* et la *fixation de l'azote* par le *Clostridium Pastorianum*, ne sont pas entravées par le bore aux doses habituellement employées pour le traitement des sols.

Au contraire, le *microbe de l'urée* pourrait être fortement gêné. Il en résulte que la transformation de l'urée en carbonate d'ammonium par ce microbe est limitée, ou même, complètement arrêtée. Toutefois, si les conditions du sol le permettent, elle peut très bien être accomplie par les espèces microbiennes ammonisantes, dont l'activité n'est pas influencée, même, par de fortes quantités de bore.

Il faut, de même, s'attendre à ce que l'*Azotobacter chroococcum* soit également gêné par le bore, surtout dans le cas, où, les conditions de milieu et particulièrement la teneur du sol en *humus* lui permettent un développement et une activité plus intense.

BIBLIOGRAPHIE

1. AGULHON, H. — *Emploi du bore comme engrais catalytique* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1910, t. 150, p. 288.)
2. — *Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux. Thèse doct. Sc. Nat. Paris, 1910.*
3. — *Présence et utilité du bore chez les végétaux* (Ann. Inst. Pasteur, 1910, t. 24, p. 321.)
4. AUBEL, E. et COLIN, H. — *Action des sucres sur la fonction pigmentaire du bacille pyocyanique* (C. R. Soc. Biolog. 1913, t. 75, p. 25.)
5. — et COLIN, H. — *Influence des sucres sur la transformation bactérienne des substances organiques azotées en sels ammoniacaux* (C. R. Soc. Biol. 1914, t. 76, p. 835.)
6. — *Sur le métabolisme microbien de l'acide lactique et de l'acide pyruvique* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1923, t. 176, p. 332.)
7. BARTLETT, J. M. — *The distillation method for the determination of borax in mixed fertilisers* (J. Assoc. Official. Agr. Chem. 1921, t. 5, p. 88. — Résumé dans Chem. Abstr. 1922, t. 16, p. 608.)
8. BEIJERINCK, M. W. — *Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen*. (Botan. Ztg. 1888, t. 46, p. 725, 741, 758.
9. — *Ueber oligonitrophile Mikroben* (Centralbl. f. Bakl. 1901, 2^e partie, t. 7, p. 561).
10. — et VAN DELDEN, A. — *Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien* (Centralbl. f. Bakl. 1902, 2^e partie, t. 9, p. 3.)
11. — et FOLPMERS, T. — *Formation of pyruvic acid from malic acid by microbes* (Koninkl. Acad. Wetensch. Amsterdam. Proceedings, 1916, t. 18, n^o 7, p. 1198.)
12. BERTHELOT, M. — *Fixation directe de l'azote atmosphérique libre par certains terrains argileux* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1885, t. 101, p. 775.)
13. BERTRAND, Gabr. — *Sur les engrais catalytiques* (Bericht. internat. Congress. Berlin, 1903, t. 3, p. 839.)
14. — *Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1905, t. 141, p. 1255.)
15. — *Les engrais catalytiques. Congrès Internat. Chimie, Rome, 1906.*
16. — *Sur les engrais catalytiques.* — VII^e Congrès de Chimie appliquée, Londres, 1909.

17. — et AGULHON, H. — *Sur la recherche de très petites quantités de bore dans l'organisme et dans les mélanges complexes* (Bull. Soc. chim. 1910, 4^e série, t. 7, p. 90.)
18. — et JAVILLIER, M. — *Influence du manganèse sur le développement de l'Aspergillus niger* (C. R. Acad. Sc. Paris 1911, t. 152, p. 225. — Ann. Inst. Pasteur, 1912, t. 26, p. 241.)
19. — et JAVILLIER, M. — *Influence combinée du zinc et du manganèse sur le développement de l'Aspergillus niger* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1911, t. 152, p. 900).
20. — *Sur l'extraordinaire sensibilité de l'Aspergillus niger vis-à-vis du manganèse* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1912, t. 154, p. 616. — Ann. Inst. Pasteur, 1912, t. 26, p. 767.)
21. — *Sur le rôle capital du manganèse dans la production des conidies de l'Aspergillus niger* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1912, t. 154, p. 381. Ann. Inst. Pasteur, 1912, t. 26, p. 773.
22. — *Sur le rôle des infiniments petits chimiques en Agriculture* (Conférence faite au 8^e Congrès de chimie appliquée à New-York, 1912. Reprod. Ann. Inst. Pasteur 1912, t. 26, p. 852. — Bull. Sc. Pharm. Janv. 1913 et Revue Scientifique, 1913.)
23. — et AGULHON, H. — *Sur l'emploi du sulfate d'aluminium, comme engrais complémentaire* (Communication faite au 8^e Congrès de chimie appl. à New-York, 1912.)
24. — et AGULHON, H. — *Sur la présence normale du bore chez les animaux* (Bull. Soc. Chim. 1913, 4^e série, t. 13, p. 396.)
25. — et AGULHON, H. — *Sur une méthode permettant le dosage de quantités extrêmement petites de bore dans les matières organiques* (Bull. Soc. chim. 1914, 4^e série, t. 15, p. 197. Ann. des Falsifications, 1914, février, p. 67.)
26. — *L'argent peut-il, à une concentration convenable, exciter la croissance de l'Aspergillus niger ?* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1914, t. 158, p. 1213.)
27. — et VLADESCO, R. — *Intervention probable du zinc dans les phénomènes de fécondation chez les animaux vertébrés* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1921, t. 173, p. 176.)
28. — et MOKRAGNATZ, M. — *Sur la présence du cobalt et du nickel dans la terre arable* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1922, t. 175, p. 112.)
29. — et MOKRAGNATZ, M. — *Sur la présence du cobalt et du nickel chez les végétaux* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1922, t. 175, p. 458.)
30. — et BENZON, B. — *Sur l'importance du zinc dans l'alimentation des animaux. Expérience sur la souris* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1922, t. 175, p. 289.)
31. — BLAIR, A. W., et BROWN, B. E. — *Influence of Fertilizers containing Borax on the Yield of Potatoes and Corn, Season 1920* (Soil. Sci. 1921, t. 11, p. 370.)
32. — BOTTOMLEY, W. B. — *Some effects of Bacteriotoxins on the Germination and Growth of Plants* (Brit. Ass. Repts, 1911.)

33. — *Significances of certain substances for Plant Growth* (Ann. Bot. 1914, t. 28, p. 531). Résumé dans *The Journ. of the Chem. Soc. Abstr. I*, 1914, p. 1208.)
34. — *Somme effects of organic Growth-promoting substances (Auximones) on the Growth of Lemna minor in mineral cultur Solution* (Proc. of the Roy. Soc. Série B, t. 89, p. 481.)
35. BOUILHAC, R. — *Sur la fixation de l'azote atmosphérique par l'association des algues et des bactéries* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1896, t. 123, p. 828.)
- 36 BOULLANGER, E. et MASSOL. — *Etudes sur les microbes nitrificateurs* (Ann. Inst. Pasteur 1903, t. 17, p. 492 et 1904, t. 18, p. 181.)
37. BOULANGER, E. — *Etudes sur les engrais catalytiques* (Ann. Inst. Pasteur, 1912, t. 26, p. 456.)
38. BRECKENRIDGE, J. E. — *Boron in Relation to the Fertilizer Industrie* (The Journ. of Industr. and Engin. Chemistry, 1921, t. 13, p. 324.)
39. BRENCHLEY, W. E. — *Inorganic plant poisons and stimulants* (Cambridge, 1914).
40. — *On the action of certain compounds of zinc, arsenic and boron on the growth of plants* (Ann. Bot. 1914, t. 28, p. 283. — Rés. dans Journ. of the Chem. Soc. 1914, Abs, t. 106, p. 1, 790.)
41. BROWN, B. E. — *Effet du borax des engrais sur le développement et la récolte des pommes de terre* (U. S. Depart. of agricult. Bull. n° 998, p. 1-8, (1922). Résumé dans Bull. Internat. Agric. Rome, 1922, t. 13, p. 1407.)
42. CARON. — *Landw. Versnchrt.* 1895, Bd. 45, p. 401. Cité d'après Fr. Lafar : *Lehrbuch der Techn. Mikrobiol.* (1904/6, t. III.)
43. CONNER, S. D. — *The injurious effect of borax on Corn* (Proc. Ind. Acad. Sc. 1917, p. 195. — Résumé dans Chem. Abstr. 1919, t. 13, p. 158.)
44. — et FERGUS, E. N. — *Borax in Fertilizers* (Ind. Agr. Exp. Sta. Bull. 1920, N° 239.)
45. — *Limning in its relation to injurious inorganic compounds in the soil* (Jour. Am. Soc. Agronom. 1921, t. 13, p. 113. Résumé dans Chem. Abstr. 1921, t. 15, p. 2325.)
46. COOK, F. C., HUTCHINSON, R. H., and SCALES, F. M. — *Experiments in the distruction of fly larvae in horse manure* (U. S. Dept. Agr. Bull. 1914, t. 118, p. 26.)
47. COOK, F. C. — *Boron : its absorption and distribution in plants and its effect on growth* (Journ. Agr. Research. 1916, t. 6, p. 877.)
48. — *Effect of three annual applications of boron on wheat* (Journ. Agr. Research. 1917, t. 10, p. 591.)
49. — et WILSON, J. B. — *Boron : its effect on crops and its distribution in plants and soil in different parts of the United States* (Journ. Agr. Research, 1918, t. 13, p. 451.)
50. CHRISTENSEN, H. R., et LARSEN, O. H. — *Untersuchung über Methoden zur Bestimmung des Kalkbedürfnisses des Bodens* (Centralbl. f. Bakl. 1911, 2^e partie, t. 29, p. 347-380.)

51. CHRISTENSEN, H. R. — *Stüdien über den Einfluss der Bodenbeschaffenheit auf das Bakterienleben und der Stoffumsatz im Erdboden* (Centralbl. f. Bakt. 1915, 2^e partie, t. 43, p. 1-166.)
52. — CURTIS, O. F. — *Stimulation of root growth in cuttings by treatment with chemical compounds* (Cornell Agr. Expt. Sta. 1918. Memoir 14, p. 78-135. Résumé dans Chem. Abstr. 1919, t. 13, p. 139.)
53. DECMEYER, R. B. — *Report on borax in mixed fertilizers* (J. Assoc. Official. Agr. Chem. 1921, t. 5, p. 86. Résumé dans Chem. Abstr. 1922, t. 16, p. 608.)
54. DEHÉRAIN et MAQUENNE. — *Sur la réduction des nitrates dans la terre arable* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1882, t. 95, p. 691, 732 et 854.)
55. DEHÉRAIN, P. P. — *Sur la composition des eaux de drainage* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1897, t. 125, p. 209.)
56. — *Sur la fixation et la nitrification de l'azote dans les terres arables* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1897, t. 125, p. 278.)
57. DÉLÉZENNE, C. — *Le zinc constituant cellulaire de l'organisme animal. Sa présence et son rôle dans le venin des serpents*. Thèse Sc. Paris, 1919.
58. DIENERT, Fred. — *Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre* (Ann. Inst. Pasteur, 1900, t. 14, p. 139.)
59. DUCLAUX, E. — *Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes* (C. R. Acad. Sc. de Paris, 1885, t. 100, p. 66.)
60. FERNBACH, A. et SCHOEN, M. — *L'acide pyruvique, produit de la vie de la levure* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1913, t. 157, p. 1478.)
61. — et SCHOEN, M. — *Nouvelles observations sur la production de l'acide pyruvique par la levure* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1914, t. 158, p. 1719.)
62. — et SCHOEN, M. — *Nouvelles observations sur la production biochimique de l'acide pyruvique* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1920, t. 170, p. 764.)
63. — et SCHOEN, M. — *L'acide pyruvique dans la fermentation alcoolique* (C. R. Soc. de Biol. 1922, 7 janvier.)
64. FOUASSIER, M. et LHOMME, J. — *Influence de l'Azotobacter ajouté au sol, sur le développement des plantes* (C. R. des Séances de l'Acad. d'Agric. de France, 1922, t. 8, p. 155. Résumé dans Bul. des Rens. Agric. de l'Inst. Internat. d'Agric. Rome, 1922, 13^e année, p. 995.)
65. FRED, Br. Edw. — *Ueber die Beschleunigung der Lebenstätigkeit höherer und niederer Pflanzen durch kleine Giftmengen* (Centralbl. f. Bakt. 1911, 2^e partie, t. 31, p. 185.)
66. FRED, E. B. et DAVENPORT, A. — *Influence of reaction on nitrogenassimilating Bacteria* (Journ. of. Agric. Research, 1918, t. 14, p. 317.)
67. FREUDENREICH, E. — *Ueber Stickstoffbindende Bakterien* (Centralbl. f. Bakt., 1903, 2^e partie, t. 10, p. 514.)
68. GAIN, Ed. et BROCC-ROUSSEAU. — *Sur les excréments des racines* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1910, t. 150, p. 1610.)
69. GAIN, Ed. — *Action de l'eau du sol sur la végétation* (Revue gén. de Bot., 1895, t. 7, p. 129.)

70. GAINNEY, P. L. — *Soil reaction and the growth of Azotobacter* (Journ. of Agric. Research., 1918, t. 14, p. 265.)
71. GERLACH et VOGEL. — *Stickstoffansammelnade Bakterien* (Centralbl. f. Bakt. 1901, 2^e partie, t. 8, p. 669.)
72. GREEN, H. H. — *Investigations into the nitrogen metabolism of Soil* (Centralbl. f. Bakt. 1914, 2^e partie, t. 41, p. 577.)
73. GREIG SMITH, R. — *The Bakteriotoxins and the Agricers of Soils* (Centralbl. f. Bakt. 1911, 2^e partie, t. 30, p. 154.)
74. HASELHOFF, E. — *Ueber die Einwirkung von Borverbindungen auf das pflanzenwachstum* (Landw. Versuchst., 1913, Bd. 79/0, p. 8 399.)
75. HECKEL, E. — *De l'action de quelques composés sur la germination des graines* (bromure de camphre, borate, silicate et arséniate de soude). (C. R. Acad. Sc. Paris, 1875, t. 80, p. 1170.)
76. HELLRIEGEL, H. et WILFARTH, H. — *Untersuchung über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Legumineusen* (Ztsch. Ver. Rub. Zuck. Ind. Nov. 1888, Beilageheft, p. 234. Ber Bot. Ges. t. 7, p. 138 (1889). Trad. Ann. Sc. Agronom. 7^e année (1890), t. 1, p. 84.)
77. HILTNER. — *Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens mit besonderen Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache* (1903).
78. HOFFMANN, C. et HAMMER, B. W. — *Some factors concerned in the fixation of nitrogen by Azotobacter* (Centralbl. f. Bakt. 1910, t. 28, p. 127.)
79. HOTTER, Eduard. — *Ueber das Vorkommen der Bor im Pflaurenreich und dessen physiologische Bedeutung* (Landw. Versuchst., 1890, Bd. 37, p. 437-458.)
80. D'HUPERT, A. — *La fatigue du sol* (Journ. Agr. pratique, 1922, t. 86, p. 136, Résumé dans le Bull. Intern. d'Agr. Rome, 1922, t. 13, p. 1265.)
81. JAVILLIER, M. — *Sur l'influence favorable de petites doses de zinc sur la végétation du Sterigmatocystis nigra* (V. Tgh.) (C. R. Acad. Sc. Paris, 1907, t. 145, p. 1212. Bull. Sc. Pharm. 1907, t. 14, p. 694.)
82. — *Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les plantes* (Thèse Doct. Sc. Nat. (1908).
83. — *Le zinc chez les plantes. Sa présence et son rôle* (Ann. Inst. Pasteur 1908, t. 22, p. 720. — Bull. Sc. Pharm. 1908, t. 15, p. 559.)
84. JAVILLIER, M. — *Sur l'emploi du zinc comme engrais complémentaire*. VII^e Congrès de Chimie appliquée, Londres, 1909.
85. — *Influence exercée par le zinc sur l'utilisation par l'Aspergillus niger de ses aliments hydrocarbonés, azotés et minéraux. Définition nouvelle des « coefficients d'utilité spécifique » des éléments*. VIII^e Congrès de Chimie appliquée, New-York, 1912; Bull. Sc. Pharm. 1912, t. 19, p. 513. Voir aussi dans C. R. Ac. Sc. Paris, 1912, t. 155, p. 190.)
86. — *Utilité du zinc pour la croissance de l'Aspergillus niger, cultivé en milieu profond* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1914, t. 158, p. 1216.)
87. JODIDI, S. L. — *Nitrogenous Compounds in Peat Soils* (J. Amer. Chem.

- Soc. 1910, t. 32, p. 396. Résumé dans *The Journ. of the Chem. Soc.* 1910. Abstr. t. 98, p. 339 (ii).
88. KASERER, H. — *Zur Kenntnis der Mineralstoffbedarfs von Azotobacter* (*Centralbl. f. Bakl.* 1910, t. 28, p. 268 ; 1911, t. 29, p. 232 et 1912, t. 30, p. 509.)
 89. KELLERMAN, KARL F. — *The effect of salts of boron up the distribution of desert vegetation* (*Bur. Plant Industrie, J. Wash. Acad. Sci.* 1920, t. 10, p. 481. Résumé dans *Chem. Abstr.* t. 15, p. 108.)
 90. KOSSOWICZ, A. — *Zur Frage der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Heffen und Schimmel pilze* (*Bioch. Ztsch.* 1914, t. 64, p. 82.)
 91. KRZEMIENIEWSKI, S. — *Untersuchung über Azotobacter chroococcum Beij* (*Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie*, 1908, p. 929-1051, et dans *Centralbl. f. Bakl.* 1909, 2^e partie, t. 23, p. 161.)
 92. LATHROP, C. Elbert. — *Normale und anormale Bestandteile der organischen Bodensubstanz* (Résumé dans *Chem. Ztg.* 1912, t. 36, p. 1141.)
 93. LAURENT, Em. — *Sur le microbe des nodosités des Légumineuses* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1890, t. 111, p. 754 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1891, t. 5, p. 105.)
 94. LIPMANN, J. G. — *Relation of Lime to Ammonification in soils* (*N. J. Agr. Ex. Sta.* 1910, 31 st. An. Rpt. p. 114.)
 95. LIVINGSTONE, BURTON, E. J., BREAZEALE, PEMBER and SKINNER. — *Further Studies on the Propeties of Unproductive Soils* (*U. S. Dept. of Agr. C. Bur. of Soils, Bull.* 36, 1907).
 96. LÖHNIS, F. et HANZAWA, J. — *Die Stellung von Azotobacter in System* (*Centralbl. f. Bakl.*, 1914, 2^e partie, t. 42, p. 1.)
 97. — et SMITH, N. R. — *Life cycles of the Bacteria* (*J. of Agric. Research*, 1916, t. 6, p. 675.)
 98. MAMELI et POLLACI. — *Sull' assimilazione diretta dell' azoto atmosferico libero nei vegetali* (*Atti Inst. bot. Pavia*, 2^e série, 1911, t. 14, p. 159.)
 99. MARSCHAL, E. — *The Production of Amomnia in the Soil by Microbes* (*Agric. Sci.*, 1894, t. 8, p. 574. Résumé dans *Centralbl. f. Bakl.* 1895, 2^e partie, t. 1, p. 753.)
 100. — *Influence des sels minéraux nutritifs sur la production des nodosités chez le pois* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 133, p. 1032.)
 101. MAZÉ, P. — *Fixation de l'azote libre par le bacille des nodosités des légumineuses* (*Ann. Inst. Pasteur*, 1897, t. 11, p. 44.)
 102. — *Les microbes des nodosités des légumineuses. Etude physiologiques* (*Ann. Inst. Pasteur*, 1898, t. 12, p. 1. *Ibid.* 1898, t. 12, p. 128 et 1899, t. 13, p. 145.)
 103. — et RUOT, M. — *Recherches sur l'assimilation de l'acide lactique par les levures et sur la production d'acide pyruvique par les levures et les oïdiums* (*C. R. Soc. de Biol.* 1917, t. 80, p. 336.)
 104. — *L'oxydation de l'acide lactique par les bactéries avec formation d'acide pyruvique et de composés cétoniques* (*C. R. Soc. de Biol.* 1918, t. 81, p. 1150.)
 105. — *Recherche d'une solution purement minérale capable d'assurer l'évolu-*

- tion complète du maïs cultivé à l'abri des microbes (*Ann. Inst. Pasteur*, 1919, t. 33, p. 139.)
106. MEUSEL, E. — *De la putréfaction produite par les bactéries en présence des nitrites alcalins* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1875, t. 81, p. 533.)
 107. MIÈCE. — *Nouveaux essais sur la désinfection du sol* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1917, t. 164, p. 362.)
 108. MOCKERIDGE, FL. A. — *Soil organic Mather as a culture medium for Azotobacter* (*Biochem. Journ.* 1915, t. 9, p. 272.)
 109. — *Some Effects of organic Growth-promat. Substances (Auximones) on the Soil Organisms* (*Proc. Roy. Soc. 1917. Série B*, t. 89, p. 508.)
 110. MOLLIARD, M. — *L'azote libre et les plantes supérieures* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1915, t. 160, p. 310.)
 111. MOREL, J. — *Action de l'acide borique sur la germination* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1892, t. 114, p. 131.)
 112. MORSE, W. J. — *Some observations upon the effect of borax in fertilizers* (*M. Agr. Exp. Sta. Bul.* 288, p. 89-120.)
 113. MÜNTZ, A. et COUDON, H. — *La fermentation ammoniacale de la terre* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1893, t. 116, p. 395.)
 114. MÜNTZ, A. et LAINÉ, E. — *Recherches sur la nitrification intensive* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1905, t. 141, p. 861.)
 115. — et LAINÉ, E. — *L'utilisation des tourbières pour la production intensive des nitrates* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1906, t. 142, p. 1239.)
 116. NAKAMURA, M. — *Can boric acid in high dilution exert a stimulant action on plants?* (*Bull. Col. Agr. Tokyo Imp. Univ.* 1903, t. 5, p. 509-512.)
 117. NELLER, J. R. et MORSE, W. J. — *Effect upon the Growth of Potatoes, Corn, and Beans, Resulting from the addition of Borax to the Fertilizer Used* (*Soil. Sci.*, 1921, t. 12, p. 79.)
 118. OERLIN. — *Bodenmüdigkeit und Schwefelkohlenstoff*. Mainz 1894.
 119. CLARU, D. — *Action favorable du manganèse sur la bactérie des légumineuses* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1915, t. 160, p. 280.)
 120. — *Rôle du manganèse en agriculture, son influence sur quelques microbes du sol*. Thèse Doct. Sc. Nat. (1919), Paris.
 121. OSSA DIAZ, B. — *La question du borax dans le salpêtre du Chili* (*Calich*, 1920, t. 1, p. 409-412. Résumé dans *Chimie et Industrie*, 1921, t. 5, p. 188.)
 122. PASTEUR, L. — *De l'origine des ferments. Nouvelles expériences relatives aux générations dites spontanées* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1860, t. 50, p. 849.)
 123. — *Etudes sur les mycodermes. Rôle de ces plantes dans la fermentation acétique* (*C. R. Acad. Sc.* 1862, t. 54, p. 265.)
 124. — *Recherches sur la putréfaction* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 56, p. 1189.)
 125. — et JOUEERT, J. — *Sur la fermentation de l'urine* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1876, t. 83, p. 1.)
 126. FELIGOT, Eug. — *De l'action que l'acide borique et les borates exercent sur les végétaux* (*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1876, t. 83, p. 686.)
 127. PICKERING, SPENCER, U, and the DUKE of BEDFORD. — *Report of the*

- Woburn Experimental Fruit Farm, London ; especially 31 d, Report, 1903, 13 th. Report 1911, and 14 th. Report 1914.
128. PLUMER, J. K. et WOLF, F. A. — *Injury to crops by borax*, 1920. N. C. Depart Ag. Bul. 275.
 129. POUGET, I. et CHOUGHAK, D. — *Sur la fatigue des terres* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1907, t. 145, p. 1200.)
 130. PROULX, DEEMER, BITTLER, THORNTON, FORT et ROBERTS. — *Injury to corn caused by borax in fertilizer* (Ind. Agr. Exp. Sta. Bul. 1918, Bul. 215, p. 16.)
 131. RAULIN, J. — *Etudes chimiques sur la végétation*. Thèse, Paris, 1870 (Ed. 1905, Masson et C^{ie}). Et *Sur les conditions chimiques de la vie des org. inf.* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1870, t. 70, p. 634.)
 132. REMY, Th. et RÜSING, G. — *Ueber die biologische Reizwirkung natürlicher Humusstoffe* (Centralbl. f. Bakl. 1911, t. 30, p. 349.)
 133. ROSS, H. Wm. — *Report on the determination of borax in fertilizers and fertilizer materials* (J. Assoc. official. Agr. Chem. 1921, t. 5, p. 80. Résumé dans Chem. Abstr. 1922, t. 16, p. 608.)
 134. RÜSING, G. — *Zusammenfassung der Ergebnisse von Untersuchungen über die Stickstoffsammlung von Azotobacter chroococcum* (Centralbl. f. Bakl. 1912, t. 23, p. 618.)
 135. RUSSEL, E. J. — *The effects of partial sterilisation of soil on the production of plant food. The limitation of bacterial numbers in soils and its consequences* (J. of Agric. Sci. 1909, t. 3, p. 111, et 1913, t. 5, p. 152, 221.)
 136. SCHLOESING, Th. et MUNTZ, A. — *Recherches sur la nitrification par les ferments organisés* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1877, t. 84, p. 301 ; 1877, t. 85, p. 892.)
 137. — et MÜNTZ, A. — *Recherche sur la nitrification* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1878, t. 86, p. 891 ; 1879, t. 89, p. 1074.)
 138. SCHLOESING fils et LAURENT, Em. — *Recherches sur la fixation de l'azote libre par les plantes* (Ann. Inst. Pasteur, 1892, t. 6, p. 65 et 824.)
 139. — SCHREINER, O. et SCHOREY, E. C. — *The isolation of harmful org. subst. from soils* (U. S. Bur. Soils. Bul. 53, 1909, p. 1-53.)
 140. — et Elbert C. LASTHROP. — *Dihydroxistearic acid in good and poor soils* (J. Amer. Chem. Soc. 1911, t. 33, p. 1412.)
 141. — *Organische Bodenbestandteile und ihre Beziehungen zur Bodenfruchtbarkeit* (Résumé dans Chem. Ztg. 1912, t. 36, p. 1079.)
 142. SCHREINER, BROWN, SKINNER et SHAPOVALOV. — *Crop injury by borax in fertilizers*. — U. S. Dept. Agr. Circ. 84 (1920).
 143. SHIN-ICHIRO KASUGAI et SHIRO OZAKI. — *The cyanuric acid in soil* (J. Sci. Agr. Soc. Japan, 1922, p. 1. Résumé dans Chem. Abstr. 1922, t. 16, p. 3155.)
 144. SKINNER, J. — *Die Wirkung von Histidin und Arginin im Boden. Conference* (Résumé dans Chem. Ztg, 1912, t. 36, p. 1272.)
 145. SOEHNGEN, N. L. — *Einfluss von Kolloiden auf microbiologischen Prozesse* (Centralbl. f. Bakl. 1913, 2^e série, t. 38, p. 621.)
 146. STOKLASA, J. — *De l'importance physiologique du manganèse et de l'alu-*

- minium dans la cellule végétale (C. R. Acad. Sc. Paris, 1911, t. 152, p. 1340.)
147. — *Katalytischer Dünger und dessen Wirkung auf die Entwicklung der Zuckerrübe* (Trad. dans le Bull. de l'Assoc. des Chimistes de sucreries et de distilleries, n° 10, avril 1911.)
148. TERNETZ. — *Ueber die Assimilation der atmosphärischen Stickstoffs durch Pilze* (Jahrbucher f. Wissenschaftl. Bot. Bd. 44, Heft. 3. Résumé dans Centralbl. f. Bot. 1908, t. 20, p. 615.)
149. TRONAG, E. et SYKORA, J. — *Soil constituents which inhibit plant toxins* (Soil Sci. 1917, t. 3, p. 333-352.)
150. TRUFFAUT, G. et BEZSSONOFF, N. — *Sur la variation d'énergie du Clostridium Pastorianum comme fixateur d'azote* (C. R. Acad. Sc. Paris 1921, t. 173, p. 868.
151. VLADESCO, R. — *Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les animaux* (Thèse, Sc. Physiques. Paris, 1921.)
152. VOELKER, J. A. — *The Influence of Boron Compounds on Wheat and Barley* (J. Roy. Agr. Soc. England, 1915, t. 76, p. 347.)
153. WHITNEY, M. — *Soil Fertility*, U. S. Dept. Agric. Bureau of Soils Farmer's Bull. n° 257. Et *The Chemistry of the Soil as Related to Crop Production* (avec F. Cameron) dans U. S. Dept. Agric. Bureau of Soils, Bull. n° 22, 1903.
154. WINOGRADSKY, S. — *Sur les organismes de la nitrification* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1890, t. 110, p. 1013. Ann. Inst. Pasteur 1890, t. 4 p. 213, 257, 760 ; 1891, t. 5, p. 92, 577.)
155. — *Zur Mikrobiologie des Nitrifikationsprozesses* (Centralbl. f. Bak. 1896, 2^e partie, t. 2, p. 415.)
156. — *Sur l'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par les microbes* (C. R. Acad. Sc. Paris, 1893, t. 116, p. 1385, et 1894, t. 118, p. 353.)
157. — *Clostridium Pastorianum, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäure ferment* (Centralbl. f. Bak. 1902, 2^e partie, t. 9, p. 43.)

TRAITÉS

- ANDRÉ, G. — *Chimie Agricole. Chimie du Sol*, 1920, Paris, Baillière et Fils.
- BERTRAND, Gabr. et THOMAS, P. — *Guide pour les Manipulations de Chimie Biologique*, 3^e édition, 1919, Paris, H. Dunot et E. Pinat.
- CZAPEK, Fr. — *Biochemie der Pflanzen. Zweite Auflage. Erstes Band* (1913). *Zweiter Band* (1920), *Dritter Band* (1921), Jena, Gustav Fischer.
- DEHÉRAIN, P. P. — *Traité de Chimie Agricole*, 2^e éd. 1902.
- DUCLAUX, E. — *Traité de Microbiologie*, Ed. 1898.
- EFFRONT, J. — *Biochemical Catalysts in Life and Industry* (traduit par S. Prescott). First edition 1917. New-York, John Wiley and Sons.

- GAIN, Ed. — *Précis de Chimie Agricole*, 2^e édition, 1918. Paris, Baillière et Fils.
- KAYSER, Ed. — *Microbiologie appliquée à la Fertilisation du Sol* (1921), Paris, Baillière et Fils.
- LAFAR, Fr. — *Handbuch der Technischen Mykologie* (1904-1906), Jena Gustav Fischer.
- LÖHNIS, F. P. — *Précis de Bactériologie Agricole et de Technique expérimentale*. Trad. par H. Kupfferath, Bruxelles.
- MACÉ, E. — *Traité Pratique de Bactériologie*, 4^e éd. 1912, Paris, Baillière et Fils.
- RUSSEL, Edw. J. — *Soil Conditions and Plant Growth* Fourth edition, 1921. London, Longmans, Green and Co.
- SHERMANN, H. C. — *Chemistry of Food and Nutrition*. Second edition, 1918, New-York, The Makmillan Company.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	I
PREMIÈRE PARTIE	
CHAPITRE PREMIER	
§ I. L'Influence du bore sur les végétaux inférieurs et sur la croissance des plantes comme toxique et excitant. Son emploi en agricul- ture	15
§ II. La question de la toxicité des engrais contenant du bore, envers les récoltes.	30
CHAPITRE II.	
Sur la combinaison de l'acide borique avec certaines substances organiques	33
DEUXIÈME PARTIE	
<i>(Recherches personnelles)</i>	
CHAPITRE PREMIER	
Plan général de mon étude et exposé des méthodes de travail employées. — L'hypothèse de l'excitation toxique. — Produits et matériel employés au cours de mes recherches	37
CHAPITRE II. — Considérations générales sur la production de l'ammo- niaque dans le sol.....	44
<i>Première section. — La fermentation de l'urée</i>	
§ I. Généralités	45
§ II. Plan de travail et conditions d'expériences.....	47
§ III. Expériences	52
§ IV. Conclusion des expériences sur la fermentation de l'urée....	58
<i>Deuxième section. — L'ammonisation.</i>	
§ I. Généralités	61
§ II. Conditions d'expériences	63
§ III. Expériences	64
§ IV. Conclusion des expériences sur l'ammonisation.....	66

	Pages
CHAPITRE III. — La nitrification	
§ I. Généralités	67
§ II. Conditions d'expérience	70
§ III. Expériences	72
§ IV. Conclusions des expériences faites sur la nitrification.....	73
CHAPITRE IV. — La fixation de l'azote atmosphérique.	
Généralités	75
A. <i>Bacillus radicola</i>	76
B. <i>Azotobacter chroococcum</i>	82
C. <i>Clostridium Pastorianum</i>	90
Etudes expérimentales	94
<i>Première section. — Bacillus radicola.</i>	
§ I. Conditions d'expériences	94
§ II. Expériences	95
§ III. Conclusions des expériences faites sur le <i>Bacillus radicola</i> ..	96
<i>Deuxième section. — (Azotobacter chroococcum)</i>	
§ I. Isolement du microbe. — Plan des expériences et conditions de travail	97
§ II. Expériences	106
§ III. Conclusions et considérations sur les expériences faites avec <i>Azotobacter chroococcum</i>	121
<i>Troisième section. — (Clostridium Pastorianum).</i>	
§ I. Conditions d'expériences	125
§ II. Expériences	127
§ III. Conclusion des expériences faites sur le <i>Clostridium Pastoria-</i> <i>num</i>	130
CHAPITRE V.	
Conclusions et considérations générales	132
Bibliographie	137

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

ADSORPTION

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 8 Juin 1923.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. MOLLIARD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

PAUL APPELL

